



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COMPARAÇÃO DE PERFIS DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* DE  
CADELA ASSOCIADOS A PIÓMETRA, CISTITE E DE ORIGEM FECAL

CAROLINA PÁRAMOS MERINO FARIA ENCARNAÇÃO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Elisabete Tomé S. Silva

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COMPARAÇÃO DE PERFIS DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* DE  
CADELA ASSOCIADOS A PIÓMETRA, CISTITE E DE ORIGEM FECAL

CAROLINA PÁRAMOS MERINO FARIA ENCARNAÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Elisabete Tomé S. Silva

2013

LISBOA

---

*À minha mãe, para sempre no meu coração*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Luísa Mateus, por ter aceitado o meu pedido de orientação, sem saber, ainda, o que a esperava. Por tudo o que me ensinou e por todo o trabalho e tempo que me dedicou. Muito obrigada!

À Doutora Elisabete Silva, porque demonstrou ser alguém com quem posso contar, não só profissionalmente como pessoalmente. Um agradecimento especial por toda a paciência, preocupação, disponibilidade e ajuda demonstradas ao longo deste período, tanto em horas de trabalho como fora delas.

À Professora Doutora Constança Pomba e à Professora Doutora Manuela Rodeia, pela disponibilização de isolados que foram uma importante contribuição para este trabalho.

A todos os colegas do CIISA, em especial à Sofia Henriques e à Marta Batista, por sempre se terem mostrado preocupadas e disponíveis para me ajudar, para além de se terem tornado duas amigas.

À Carla Carneiro, não só pelo contributo que deu a este trabalho, mas também por toda a paciência, incentivo e amizade que demonstra nas suas palavras e actos.

Aos médicos, estagiários, enfermeiros, auxiliares e recepcionistas do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, por terem tornado o meu estágio numa boa experiência de aprendizagem.

Ao meu pai e irmãos, porque sem vocês não seria quem sou hoje. Vocês dão-me a força que preciso e cada um tem a sua contribuição especial na minha vida.

À Marisa Ferreira, pela motivação e companhia nas longas tardes ou dias de trabalho e, especialmente, por ser uma das melhores novas aquisições para o meu círculo.

A todos os meus amigos, em especial à Sofia, ao Tiago e ao João, amigos de longa data que, mesmo não sendo da área, me ouvem falar de veterinária sem nunca se importar. Ana Afonso, Ana Isabel, Bolacha, Felipe, Laura, Marta, Pedro, Rui e Tabanez, vocês tornaram os últimos anos inesquecíveis!

À Alexandra, à Daniela e ao Diogo, porque sei que serão os primeiros a gritar viva com os meus sucessos, os primeiros a dar-me força quando achar que não consigo mais e que vão estar sempre na primeira fila a torcer por mim. A vossa amizade é inestimável e indispensável!

## RESUMO

*Escherichia coli* (*E. coli*) é a bactéria gram-negativa mais comumente encontrada na microbiota do tracto gastrointestinal e a mais frequentemente isolada em casos de infecção do tracto urinário (ITU) e piómetra em cadelas. A sua patogenicidade está associada à presença de factores de virulência (FVs), alguns deles codificados em ilhas de patogenicidade (PAIs). Este estudo teve como objectivo comparar os perfis de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas que desenvolveram piómetra, cistite e de origem fecal. Foi avaliada a presença de genes que codificam para 13 FVs e marcadores de 8 ilhas de patogenicidade em 31 isolados de *E. coli* de piómetra, 23 isolados de cistite e 26 isolados de fezes obtidos de cadelas saudáveis.

Independentemente da origem dos isolados, o número médio de PAIs e genes de virulência foi maior nos isolados pertencentes ao grupo filogenético B2, do que nos outros grupos filogenéticos. As PAIs I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub> e II<sub>J96</sub> e os genes de virulência *hlyA* e *cnf1* foram detectados exclusivamente no grupo filogenético B2. A prevalência dos isolados pertencentes ao grupo filogenético B2 foi maior nos casos de piómetra (94%) do que nos isolados de cistite (48%) e de origem fecal (39%). As PAIs IV<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub> e os genes *fyuA*, *chuA* e *sfa/focDE* foram significativamente mais prevalentes em isolados de piómetra do que nos outros grupos. A presença de vários sistemas de captação de ferro, de adesinas e de diferentes ilhas que codificam FVs com a mesma função biológica é comum a isolados dos três grupos.

Este estudo indica que as estirpes de *E. coli* que colonizam o útero têm um elevado potencial de virulência, possuindo um grande número de PAIs e genes de virulência. No entanto, existem isolados de cistite e de origem fecal com as mesmas características, o que sugere que poderão induzir piómetra, em cadelas susceptíveis. Além disso, a ampola rectal é reservatório de estirpes de *E. coli* do grupo filogenético B2 e D.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, factores de virulência, ilhas de patogenicidade, infecção do tracto urinário, piómetra, cadela.

## **ABSTRACT**

*Escherichia coli* (*E. coli*) is the gram negative bacteria most commonly found in the gastrointestinal tract microbiota and the most frequently isolated in urinary tract infections and pyometra cases in bitches. Its pathogenicity is associated with the presence of virulence factors (VFs), some of which are encoded on pathogenicity associated islands (PAIs). The objective of this study was to compare the virulence profiles of canine *E. coli* isolates from pyometra, cystitis and faecal origin. To accomplish that, the presence of genes encoding for 13 VFs and markers for 8 PAIs was evaluated in 31 *E. coli* pyometra isolates, 23 cystitis isolates and 26 fecal isolates obtained from healthy bitches.

Regardless the isolates' origin, the average number of virulence traits per strain was higher in B2 than in the other phylogenetic groups (A, B1, D). Certain PAIs (I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub> e II<sub>J96</sub>) and virulence genes (*hlyA* and *cnf1*) were found exclusively in phylogenetic group B2. The prevalence of phylogenetic group B2 was significantly higher in pyometra (94%) than in cystitis (48%) and faecal (39%) isolates. Virulence traits which were more prevalent in pyometra than in cystitis and fecal isolates included two PAIs (PAI IV<sub>536</sub>, PAI I<sub>CFT073</sub>) and three VF genes (*sfa/focDE*, *fyuA*, *chuA*). The presence of genes for several iron acquisition systems, adhesins and different PAIs which encode for VFs with the same biological function were common in isolates from all 3 groups.

In conclusion, pyometra isolates have a high potential of virulence and a broad virulence genotype, although being similar to a subset of cystitis and fecal isolates. This leads to the suggestion that cystitis and fecal isolates may be able to induce pyometra in receptive hosts. Also, the rectum is a reservoir for strains belonging to phylogenetic groups B2 and D.

**Key words:** *Escherichia coli*, virulence factors, pathogenicity islands, urinary tract infection, pyometra, bitch.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....	1
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS .....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
I – Piómetra .....	5
Componente bacteriana .....	6
Componente hormonal .....	7
Sinais clínicos e indicadores laboratoriais.....	9
Diagnóstico Imagiológico .....	10
Tratamento .....	10
II – Infecção do Tracto Urinário .....	12
Introdução.....	12
Etiologia e patogenia.....	13
Sinais clínicos e diagnóstico .....	15
Tratamento .....	16
III – <i>Escherichia coli</i> .....	17
História e características morfológicas .....	17
Factores de virulência de <i>Escherichia coli</i> .....	18
Adesinas .....	18
Sistemas de captação de ferro.....	20

Toxinas .....	23
Outros .....	24
Ilhas de patogenicidade .....	24
MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
Caracterização da população .....	26
Isolamento e identificação .....	26
Extracção de ADN .....	27
Identificação de ilhas de patogenicidade e dos genes que codificam para factores de virulência .....	27
Determinação do grupo filogenético .....	31
Análise estatística .....	32
RESULTADOS .....	33
Prevalência dos marcadores de ilhas de patogenicidade .....	33
Associação entre ilhas de patogenicidade e grupos filogenéticos .....	33
Combinação de ilhas de patogenicidade nos isolados de E. coli de piómetra, cistite e origem fecal .....	36
Associação entre ilhas de patogenicidade e os fenótipos dos isolados .....	37
Prevalência dos genes que codificam para factores de virulência .....	38
Associação entre factores de virulência .....	40
Associação entre factores de virulência e grupos filogenéticos .....	43
Associação entre genes que codificam para factores de virulência e os fenótipos dos isolados .....	45
Avaliação dos perfis de virulência .....	47
DISCUSSÃO .....	49
CONCLUSÃO .....	54
BIBLIOGRAFIA .....	55
ANEXOS .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Dendrograma obtido através do perfil de virulência dos isolados analisados .....	48
---	----

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos de defesa do tracto urinário do hospedeiro (adaptado de Nelson & Couto, 2003).....	14
Tabela 2 – Número de unidades formadoras de colónias por mililitro de urina consideradas significativas de acordo com o método de colheita (Adaptado de Nelson & Couto, 2003) ....	15
Tabela 3 – Proteínas associadas à síntese (S), excreção (E), reconhecimento (R), internalização (I) e libertação do ferro (L) dos diferentes sideróforos.....	22
Tabela 4 – Factores de virulência codificados nas ilhas de patogenicidade. ....	25
Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para os marcadores das PAIs em estudo, PAIs alvo, temperaturas de hibridação (TH) utilizadas na reacção de PCR e tamanhos dos fragmentos amplificados (Adaptado de Bronowski <i>et al.</i> ).....	29
Tabela 6 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção dos genes de virulência e grupos filogenéticos, temperaturas de hibridação (TH), tamanho da região amplificada por PCR, controlos positivos (C+) e referência para condições de reacção .....	30
Tabela 7 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na determinação do grupo filogenético, temperaturas de hibridação (TH), tamanho da região amplificada por PCR, controlos positivos (C+) e referência para condições de reacção .....	31
Tabela 8 – Distribuição do número de ilhas de patogenicidade por grupos de isolados e grupos filogenéticos .....	34
Tabela 9 – Distribuição dos marcadores de ilhas de patogenicidade em isolados de piómetra, cistite e fecais, de acordo com o grupo filogenético .....	35
Tabela 10 – Combinação de marcadores de PAIs nos isolados de piómetra .....	36
Tabela 11 – Combinação de marcadores de PAIs nos isolados de cistite .....	36
Tabela 12 – Combinação de marcadores de PAIs em isolados fecais.....	37
Tabela 13 – Distribuição dos genes que codificam para as diferentes classes de factores de virulência em relação à origem dos isolados .....	40
Tabela 14 – Combinação de genes que codificam para sistemas de captação de ferro em isolados de piómetra .....	41
Tabela 15 – Combinação de genes que codificam para sistemas de captação de ferro em isolados de cistite .....	41
Tabela 16 – Combinação de genes que codificam para sistemas de captação de ferro em isolados fecais.....	41
Tabela 17 – Combinação de genes que codificam para adesinas em isolados de piómetra	42

Tabela 18 – Combinação de genes que codificam para adesinas em isolados de cistite .....	42
Tabela 19 – Combinação de genes que codificam para adesinas em isolados fecais .....	42
Tabela 20 – Combinação de genes que codificam para hemolisina, CNF-1 e Usp em isolados de piómetra .....	42
Tabela 21 – Combinação de genes que codificam para hemolisina, CNF-1 e Usp em isolados de cistite.....	43
Tabela 22 – Combinação de genes que codificam para hemolisina, CNF-1 e Usp em isolados fecais.....	43
Tabela 23 – Número de genes que codificam para factores de virulência em relação à origem dos isolados e ao grupo filogenético .....	43

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Prevalência dos marcadores de ilhas de patogenicidade nos isolados de <i>E. coli</i> de piômetra, de cistite e de origem fecal .....	33
Gráfico 2 – Prevalência dos grupos filogenéticos nos isolados das várias origens .....	34
Gráfico 3 – Prevalência dos diferentes fenótipos nos isolados de <i>E. coli</i> de piômetra, cistite e de origem fecal .....	37
Gráfico 4 – Associação entre ilhas de patogenicidade e os fenótipos dos isolados das colônias de <i>E. coli</i> .....	38
Gráfico 5 – Prevalência dos genes que codificam adesinas nos isolados das várias origens .....	38
Gráfico 6 – Prevalência dos genes que codificam sistemas de captação de ferro nos isolados das várias origens.....	39
Gráfico 7 – Prevalência de genes que codificam toxinas e proteína específica uropatogénica nos isolados de piômetra, cistite e de origem fecal .....	40
Gráfico 8 – Associação de sistemas de captação de ferro e grupos filogenéticos.....	44
Gráfico 9 – Associação entre genes que codificam para adesinas e grupos filogenéticos....	44
Gráfico 10 – Associação entre genes que codificam para toxinas e proteína específica uropatogénica e grupos filogenéticos.....	45
Gráfico 11 – Associação entre genes que codificam para sistemas de captação de ferro e fenótipos dos isolados .....	45
Gráfico 12 – Associação entre genes que codificam para adesinas e fenótipos dos isolados .....	46
Gráfico 13 – Associação entre genes que codificam para a hemolisina, CNF-1 e Usp e fenótipo dos isolados .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
ARNt	Ácido Ribonucleico Transportador
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIEC	<i>Adherent-invasive Escherichia coli</i>
ALT	Alanina aminotransferase
APEC	<i>Avian pathogenic Escherichia coli</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BHiB	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
bp	<i>base pair</i>
C+	Controlo positivo
COS	Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CNF	Factor necrosante citotóxico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Enteraggregative Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
ExPEC	<i>Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli</i>
FV	Factor de virulência
HEFMV	Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária
HQE	Hiperplasia Quística do Endométrio
HQE-P	Complexo Hiperplasia Quística do Endométrio-Piómetra
IMViC	<i>Indole Methyl red Voges-Proskauer Citrate</i>
InPEC	<i>Intestinal Pathogenic Escherichia coli</i>
PAI	Ilha de patogenicidade
ITU	Infecção do tracto urinário
kb	kilobase
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligramma
mM	Milimolar
ml	Mililitro
HAMR	Hemaglutinação Manose-resistente
HAMS	Hemaglutinação Manose-sensível
nM	Nanomolar
NMEC	<i>Neonatal meningitis-associated Escherichia coli</i>
OVH	Ovariohisterectomia
PAI	<i>Pathogenicity-associated Island</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	Rotações por minuto
SEPEC	<i>Sepsis-associated Escherichia coli</i>
sp	<i>Species</i>
spp	<i>Species pluralis</i>
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistémica
TH	Temperatura de hibridação
TSA	Teste de sensibilidade a antibióticos
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TTA	<i>Tibial Tuberosity Advancement</i>
U	Unidade internacional
UFC	Unidades formadoras de colónias
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia Coli</i>
Usp	<i>Uropathogenic specific protein</i>
UV	Ultra-violeta
VF	Virulence factor



## RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi dividido em 3 áreas: na área de cirurgia e clínica de pequenos e grandes animais, no Hospital Escolar da “*Swedish University of Agricultural Sciences*” (SLU) (Uppsala, Suécia); na área de clínica e cirurgia no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV), Universidade de Lisboa e na área de investigação no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), sob orientação da Professora Luísa Maria Freire Leal Mateus e co-orientação da Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva.

O estágio na SLU foi constituído por 3 fases diferentes. A primeira fase teve início a 5 de Setembro de 2011 e fim a 28 de Outubro de 2011. Nestas 8 semanas, tive oportunidade de acompanhar os serviços de Medicina Interna, Fisioterapia, Internamento e Cirurgia, com principal ênfase neste último. No serviço de Medicina Interna tive a oportunidade de acompanhar algumas consultas de referência, discutindo com o Médico Veterinário possíveis diagnósticos diferenciais, plano diagnóstico e terapêuticas adequadas. No serviço de Fisioterapia acompanhei a consulta antecedente a cada sessão de fisioterapia em que se avaliou o animal, identificando os ossos e músculos envolvidos na afecção e, posteriormente, presenciei a sessão de fisioterapia. No Internamento, fiz a discussão dos casos de todos os animais internados com o médico veterinário, realizando o exame físico e avaliando a evolução de cada animal. No serviço de Cirurgia, acompanhei os animais intervencionados, desde a sua admissão no internamento de cirurgia, exame físico pré-cirúrgico, preparação do paciente e cirurgia. Tive oportunidade de realizar orquiectomias e ovariectomias em gatos. Para além da rotação pelos vários serviços, durante uma semana, participei ainda em seminários com discussão de temas variados (hematologia, cardiologia, pneumologia e reprodução) e casos clínicos.

A segunda fase do estágio na SLU decorreu de 31 de Outubro a 18 de Novembro de 2011. Nesta fase, acompanhei as aulas práticas de Medicina de Ruminantes, praticando diversos procedimentos, tais como, recolha de sangue, cateterização e anestesia. Pude, ainda, fazer o exame físico, tanto dos animais internados, como dos animais das explorações, elaborar uma lista de diagnósticos diferenciais e plano diagnóstico e terapêutico.

Na última fase do estágio na SLU, de 21 de Novembro a 9 de Dezembro de 2011, acompanhei as aulas de Reprodução de pequenos animais, tendo tido oportunidade de relembrar várias matérias e procedimentos tais como, realização e avaliação de citologias vaginais.

De uma maneira geral, o estágio na SLU permitiu-me consolidar conhecimentos já adquiridos e também aprender novos procedimentos e técnicas. Para além disso, deu-me a

conhecer uma realidade médico-veterinária diferente da existente em Portugal, tendo sido uma experiência muito rica, tanto académica como culturalmente.

O estágio em cirurgia e clínica de pequenos animais no HEFMV, iniciou-se em Janeiro de 2012 e prolongou-se até ao final de Junho do mesmo ano. Durante este período, foi feita uma rotação pelos serviços de Medicina Interna e Internamento (aproximadamente 4 meses), Imagiologia (aproximadamente 3 semanas) e Cirurgia (2 meses).

No serviço de Medicina Interna, tive a oportunidade de acompanhar primeiras consultas, consultas de seguimento e consultas de referência inseridas nas mais variadas áreas, tais como, cardiologia, oftalmologia, endocrinologia, dermatologia, neurologia, oncologia, reprodução e obstetrícia e ortopedia. Nestas, foi possível fazer a recolha da anamnese e exame físico, sendo depois os dados obtidos discutidos com o médico veterinário responsável, bem como os possíveis diagnósticos diferenciais, plano diagnóstico e terapêuticas adequadas. Tive oportunidade de realizar colheitas de sangue e urina (de forma livre ou por algaliação) e assistir a colheitas de líquido céfalo-raquidiano. Foram aperfeiçoados os conhecimentos acerca de hemograma e análises bioquímicas e a sua interpretação, assim como outros métodos de diagnóstico, tais como o electrocardiograma e citologias.

No Internamento, em turnos de 24 horas, fiz a recepção de animais e participei no desenho do plano de internamento, discutindo-o com o médico veterinário responsável, de forma a compreender o plano diagnóstico e a terapêutica aplicada. Procedi à administração de medicação, tanto parenteral como oral, alimentação, água e passeio dos animais. Foi promovido o espírito de equipa, trabalhando com médicos veterinários, enfermeiros veterinários, auxiliares de acção médico-veterinária e alunos.

No serviço de Imagiologia, acompanhei vários exames radiológicos, auxiliando no posicionamento dos animais e monitorizando a anestesia, sempre que necessário. Posteriormente, procedi à interpretação das projecções obtidas com o médico veterinário. Foi ainda possível assistir e auxiliar em várias ecografias abdominais.

No período de Cirurgia, foi possível sedimentar conhecimentos acerca da preparação do paciente, das induções anestésicas nos vários tipos de pacientes, para além das monitorizações necessárias durante o tempo de anestesia. Pratiquei a colocação de cateteres e tubos endotraqueais e realizei vários tipos de suturas e procedimentos cirúrgicos simples, como destartarizações, ovariohisterectomias e orquiectomias em cães e gatos, sempre sob supervisão de um médico veterinário. Acompanhei ainda cirurgias de oftalmologia, tais como resoluções de entrópion, de ortopedia, como resoluções de fracturas e hérnias discais, recessões da cabeça do fémur e *Tibial Tuberosity Advancement* (TTA), e

de tecidos moles, como, por exemplo, esplenectomias, enterotomias, mastectomias, excisões de nódulos e colocações de tubos de traqueostomia. Assisti a várias endoscopias tanto alta como baixa, o que permitiu uma desmistificação desta técnica e compreensão da mesma, das suas utilizações, vantagens e desvantagens.

Sempre que possível, realizei pensos e remoções de pontos de pele, fazendo o acompanhamento pós-cirúrgico dos pacientes.

Os 6 meses de estágio no HEFMV permitiram consolidar os conhecimentos de 5 anos de curso e compreender a dinâmica do funcionamento de um hospital e de uma equipa de trabalho.

Entre Março e Agosto de 2012, foi desenvolvido, no CIISA, trabalho de investigação, o qual foi a base desta Dissertação. Durante esses 6 meses, houve a possibilidade de integrar o ambiente de laboratório e adquirir conhecimentos numa área praticamente inexplorada durante a formação académica em Medicina Veterinária. Assim, com a colaboração, não só da Doutora Elisabete Silva, mas também da Sofia Henriques (estudante de Doutoramento), desenvolvi mais-valias, neste campo, que compreendem a extracção de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), realização de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e corrida de géis de agarose por electroforese.

Este trabalho faz parte do projecto “Contribuição para o estudo da fisiopatologia do complexo hiperplasia quística do endométrio – piómetra na cadela”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – PTDC/CVT/66587/2006 e pelo CIISA/FMV 74 – Hiperplasia do endométrio. Parte do trabalho foi submetida e aceite para publicação:

Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L., Silva, E. (2013). Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Veterinary Microbiology*. (doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.018>; *In Press*).

## INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

*Escherichia coli* (*E. coli*) é a bactéria gram-negativa mais prevalente na microbiota das fezes de mamíferos. Apesar do seu carácter comensal em alguns casos, existem estirpes que possuem características que lhes dão uma maior capacidade de causar doença. Estas características são conferidas por factores de virulência (FVs) que incluem as adesinas, os sistemas de captação de ferro, as toxinas, entre outros factores. Os genes que codificam esses FVs estão, frequentemente, localizados em grandes blocos genéticos denominados ilhas de patogenicidade (PAIs). Uma das características destas ilhas é serem elementos móveis que facilmente sofrem transmissão horizontal, criando uma enorme diversidade genética. Alguns destes FVs e PAIs estão especificamente associados a algumas estirpes de *E. coli*. As estirpes de *E. coli* extraintestinais causam doenças associadas ao tracto urogenital, tais como a infecção do tracto urinário (ITU) e a piómetra: duas doenças com uma grande expressão em Medicina Veterinária.

As bactérias que causam estes dois tipos de afecção provêm do tracto gastrointestinal e, devido à expressão de vários FVs, ou por falha nos mecanismos de defesa do hospedeiro, conseguem ascender ao tracto urogenital. A cistite é a entidade clínica mais comumente referida como ITU, no entanto, em raros casos, a infecção pode estender-se aos ureteres e rins. No caso da piómetra, para além de uma componente bacteriana, existem também factores hormonais que predis põem ao desenvolvimento da doença.

Tendo em conta a elevada prevalência de ITU e piómetra em cadelas e o facto de *E. coli* ser a bactéria mais prevalente nestas afecções, este trabalho teve como objectivos:

- Comparar a presença de marcadores moleculares das PAIs e de genes que codificam para FVs em isolados de 3 origens diferentes (piómetra, cistite e fezes);
- Avaliar a associação da presença das PAIs e dos genes de virulência com o fenótipo das colónias;
- Efectuar a caracterização filogenética e associar o grupo filogenético à presença/ausência dos determinantes de virulência (marcadores genéticos para as PAIs e genes para FV) e à origem dos isolados;
- Relacionar os perfis de virulência (presença de marcadores das PAIs, dos genes de virulência e o grupo filogenético) com a capacidade dos isolados de piómetra e cistite para causar doença.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I – Piómetra

Piómetra designa uma infecção e inflamação do útero com acumulação de pus no seu interior associada a doença sistémica (Ettinger & Feldman, 2010; Hagman, Lagerstedt, Hedhammar, & Egenvall, 2011), podendo levar à morte em 3 a 4% dos casos (Egenvall, Hagman, Bonnett, Hedhammar, Olson, & Lagerstedt, 2001; Hagman, Kindhal, & Lagerstedt, 2006; Hagman, Reezigt, Ledin, & Karlstam, 2009). Ocorre principalmente na primeira metade do diestro, caracterizada por concentrações elevadas de progesterona e moderadas de estrogénio (Onclin, Murphy, & Verstegen, 2002; Sugiura *et al.*, 2004). Alguns estudos sugerem que animais nulíparos (Niskanen & Thrusfield, 1998; Fukuda, 2001; Smith, 2006; Hagman *et al.*, 2011) e com mais de 4 anos (Smith, 2006), principalmente entre os 8 e 11 anos (Fukuda, 2001), têm uma maior predisposição para o desenvolvimento de piómetra. É uma doença bastante comum, principalmente em países em que a esterilização electiva de fêmeas ainda não é uma prática amplamente difundida (Niskanen & Thrusfield, 1998; Hagman *et al.*, 2009), afectando cerca de um quarto de todas as cadelas inteiras antes dos 10 anos de idade (Egenvall *et al.*, 2001; Hagman, 2004). As raças mais predispostas parecem ser o Golden Retriever, o Schnauzer Miniatura, o Irish Terrier, o São Bernardo, o Airedale Terrier, o Cavalier King Charles Spaniel, o Collie de pêlo comprido, o Rottweiler, o Boieiro de Berna e o Pastor Alemão (Niskanen & Thrusfield, 1998; Egenvall *et al.*, 2001; Smith, 2006; Hagman *et al.*, 2011). Entre as raças com menor predisposição para o desenvolvimento da piómetra encontram-se os Dachshund standard e miniatura (Niskanen & Thrusfield, 1998; Hagman, 2004) e certos estudos referem que animais com raça indeterminada também apresentam um factor de protecção para esta doença (Niskanen & Thrusfield, 1998). Estudos acerca de outros factores protectores ou predisponentes, como o tratamento com progestagénios, têm demonstrado resultados contraditórios. Niskanen e Thrusfield (1998) e Whitehead (2008) encontraram uma relação entre o tratamento hormonal e o desenvolvimento da piómetra, principalmente em cadelas até aos 4 anos de idade, e um estudo realizado por Fidler, Brodey, Howson, & Cohen (1966) concluiu que a pseudogestação pode ter um papel protector no aparecimento da doença. No entanto, Hagman *et al.* (2011) obtiveram resultados contrários aos dos três estudos anteriormente apresentados.

## Componente bacteriana

Embora diferentes bactérias possam ser isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piómetra, tais como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. (Verstegen, Dhaliwal, & Verstegen-Onclin, 2008), *E. coli* é a bactéria mais comumente associada a esta afecção (90% dos casos, segundo Fransson, 2003) (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Van Den Broeck, & Coryn, 2001; Hagman & Greko, 2005; Arora, Sandford, Browning, Sandy, & Wright, 2006; Hagman *et al.*, 2009). Isto pode dever-se, não só ao facto de fazer parte da microbiota vaginal resultante de contaminação fecal/urinária (Hagman, 2004), mas também por ter capacidade de ligação a receptores específicos no endométrio quando este é estimulado pela progesterona (Hagman, 2004). A contaminação uterina ocorre durante o proestro e o estro, e o estabelecimento e desenvolvimento da infecção ocorre no diestro (Pretzer, 2008). Vários estudos evidenciam que os isolados de *E. coli* obtidos de útero de cadelas com piómetra têm características semelhantes às dos isolados fecais do mesmo animal (Wadås, Kühn, Lagerstedt, & Jonsson, 1996; Hagman & Kühn, 2002). Deste modo, confirma-se a hipótese mais provável de que a infecção ocorre de forma ascendente através de contaminação fecal do próprio animal e não está associada a contaminação entre animais ou pelo ambiente. A mesma correspondência foi conseguida em isolados de infecção do tracto urinário inferior (cistite), comumente associada a piómetra (Stone, Littmann, Robertson, & Bovée, 1988; Wadås *et al.*, 1996; Hagman & Kühn, 2002). No entanto, a dúvida mantém-se acerca da via de infecção. Por um lado, pensa-se que é possível a ascensão deste microrganismo a partir do tracto urinário para o útero durante uma fase susceptível do ciclo éstrico, por outro, põe-se a hipótese da contaminação do tracto urinário ser feita através do corrimento vaginal (Fransson & Ragle, 2003).

O facto do isolamento de alguns serotipos de *E. coli* ser mais comum do que outros, no que diz respeito a piómetra, poderá estar relacionado com a presença de certos FVs (Chen, Wright, Lee, & Browning, 2003; Arnold, S., Hubler, M., Reichler, I., 2006), os quais poderão ser responsáveis pelo aumento da capacidade de invasão, de destruição tecidual e de disponibilização de ferro importante para o crescimento bacteriano (Chen *et al.*, 2003).

Tal como todas as bactérias gram-negativas, *E. coli* apresenta na constituição da sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS). Esta endotoxina é libertada aquando do crescimento exacerbado ou destruição bacteriana (Hagman *et al.*, 2006). Por outro lado, o LPS liga-se a receptores na membrana celular e induz a produção de mediadores inflamatórios (Pelander, Hagman, & Häggström, 2008) que levam ao aparecimento de febre, letargia, taquicardia e taquipneia (Hagman, 2004), podendo resultar em choque séptico do animal (Pretzer, 2008) e morte (Hagman *et al.*, 2006). Os seus efeitos surgem, apenas,

quando a sua concentração sistémica ultrapassa a capacidade de depuração do fígado (Hagman, 2004).

O Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SRIS) não é um desenvolvimento incomum em casos de piómetra, tendo sido identificado em 50 a 70% das cadelas com piómetra (Fransson, 2003; Karlsson *et al.*, 2012). O SRIS define-se como a libertação de mediadores inflamatórios a nível sistémico, em resposta a um estímulo inflamatório local (Fransson, 2003). A avaliação de um paciente com SRIS baseia-se na presença/ausência de diversos sinais clínicos e é extremamente importante, pois está associado a um pior prognóstico dos animais, devido à possível progressão desta síndrome para uma falência multi-orgânica (Fransson, 2003).

### **Componente hormonal**

Sendo a piómetra uma doença com causas multifactoriais, para além do tipo de bactéria e do seu potencial de virulência, também factores hormonais estão envolvidos no seu desenvolvimento, originando alterações uterinas que propiciam o desenvolvimento bacteriano (Hagman, 2004; Hagman *et al.*, 2011). Esta informação é sustentada pelo facto de a ovariectomia bilateral prevenir o desenvolvimento da doença (Hagman, 2004). Assim, concentrações elevadas de progesterona conduzem à proliferação das glândulas do endométrio e das suas secreções, minimizam as contracções do útero e promovem o encerramento do cérvix (Smith, 2006). Para além disso, ocorre diminuição da imunidade local (Sugiura *et al.*, 2004; Smith, 2006), inibindo a produção de citocinas, as quais têm um papel importante na migração de neutrófilos e monócitos para o útero (Sugiura *et al.*, 2004). Cria-se, assim, um ambiente propício ao desenvolvimento bacteriano. Contrariamente à acção da progesterona, os estrogénios promovem alterações no epitélio, impedindo a adesão bacteriana (Nishikawa, 1985; Nishikawa & Baba, 1985), e aumentam a produção de lactoferrina, uma glicoproteína bactericida (Teng, Beard, & Gladwell, 2002; Kida *et al.*, 2006). Durante o diestro, a acção dos estrogénios é menor, o que facilita a infecção. Os efeitos cumulativos da progesterona com a repetição dos ciclos éstricos explicam uma maior predominância desta doença em cadelas a partir da meia-idade (Pretzer, 2008). Por outro lado, a estimulação prévia do útero pelos estrogénios, parece potenciar os efeitos da progesterona (Dow, 1958), o que explicará a maior predisposição de cadelas às quais foram administrados progestagénios durante o proestro e estro (Niskanen & Thrusfield, 1998; Whitehead, 2008). Pensa-se que a sua acção na patofisiologia da doença possa estar ligada à promoção do aumento da sensibilidade uterina para a progesterona, ao aumentar o número e avidéz dos receptores de progesterona no útero (Ververidis *et al.*, 2004).

A expressão dos receptores de hormonas esteróides no útero parece estar alterada em úteros que desenvolveram piómetra ou hiperplasia quística do endométrio (HQE) quando

comparada com úteros de cadelas saudáveis (De Cock, Vermeirsch, Ducatelle, & De Schepper, 1997; Sauerwein *et al.*, 1998; De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Simoens, & Coryn, 2002; Ververidis *et al.*, 2004). Segundo De Bosschere *et al.* (2002), o controlo negativo por parte da progesterona, sobre os receptores de estrogénio no útero, não se verifica em cadelas que desenvolvem HQE. Como consequência, o útero mantém-se sensível a níveis baixos de estrogénio numa fase em que a progesterona já se encontra em concentrações elevadas.

A hiperplasia quística resulta de uma reacção anormal do útero à estimulação crónica pela progesterona durante a fase lútea do estro (De Bosschere *et al.*, 2001). Não está associada a doença sistémica pois trata-se de uma alteração histopatológica caracterizada por glândulas endometriais quísticas que variam em tamanho, número, distribuição, histomorfologia e relevância clínica (Dow, 1958; Ettinger & Feldman, 2010). O facto de ocorrerem alterações nas glândulas endometriais, que causam a sua hiperplasia e hipertrofia, pode conduzir a acumulação de fluido estéril nas mesmas, assim como no lúmen uterino (mucómetra, hidrómetra) e ao espessamento da parede endometrial (Dow, 1958; De Bosschere *et al.*, 2001).

Dow (1957) propôs que a HQE fosse o início do desenvolvimento de um processo patológico que culmina na piómetra como o estadio final e mais grave, formando o complexo hiperplasia quística do endométrio-piómetra (HQE-P). Classificou ainda o HQE-P em quatro estadios baseados numa avaliação clínica e anátomo-patológica. O estadio I inclui animais com HQE não complicada, em que o endométrio se encontra espessado, com formações quísticas e glândulas irregulares, não associadas a reacção inflamatória local e em que não existem sinais clínicos relevantes. No estadio II, para além das alterações do estadio anterior, verifica-se ainda infiltração de células inflamatórias no endométrio e presença de muco no lúmen uterino. O estadio III é caracterizado por HQE associada a endometrite aguda. Há congestão, edema e infiltração de neutrófilos no endométrio. A quantidade de conteúdo presente no lúmen uterino é mais acentuada do que no estadio anterior e a sua cor e viscosidade é variável. O último estadio, o estadio IV, é considerado como uma endometrite crónica/piómetra. Este pode ser subdividido, conforme o cérvix uterino se encontre aberto ou fechado. Em casos em que o cérvix se encontra aberto, as paredes uterinas encontram-se espessadas, verifica-se hipertrofia e fibrose do miométrio e hipertrofia do endométrio com infiltração de células inflamatórias. Não há grande quantidade de fluido no interior do útero, mas há corrimento vulvar e os sinais clínicos são moderados. Quando o cérvix uterino está fechado, as paredes uterinas estão distendidas e muito finas, devido à acumulação de conteúdo intra-uterino, e tanto o endométrio como o miométrio estão atrofiados. Neste caso os sinais clínicos são bastante graves.

Embora a piómetra tenha sido anteriormente ligada à HQE, De Bosschere *et al.* (2001) sugere que as duas entidades podem não estar correlacionadas, devido às diferenças na sua manifestação clínica, morfologia e também na possibilidade de se poderem desenvolver separadamente. No entanto, não se pode excluir a ideia de que cadelas com hiperplasia quística do endométrio tenham uma predisposição para desenvolver piómetra (De Bosschere *et al.*, 2001), já que as alterações uterinas provocadas pela HQE (tal como excesso de secreções uterinas, presença de quistos glandulares e degenerescência celular) criam boas condições para a proliferação de bactérias e o estabelecimento da infecção (Verstegen *et al.*, 2008).

### **Sinais clínicos e indicadores laboratoriais**

Os sinais clínicos mais comuns são inapetência, letargia, poliúria, polidipsia, prostração, vômito, febre ou hipotermia, alteração da cor das membranas mucosas, frequências respiratória e cardíaca elevadas e distensão e dor abdominal (Smith, 2006; Hagman *et al.*, 2009; Hagman *et al.*, 2011). Pode ou não ocorrer corrimento vaginal, dependendo se o cérvix se encontra aberto ou fechado, respectivamente. As piómetras em que o cérvix se encontra fechado são consideradas emergências médicas devido à probabilidade de sepsis, toxémia e morte do animal (Smith, 2006). O tipo de corrimento observado (purulento ou sanguíneo-purulento) está associado à espécie bacteriana isolada, bem como ao seu arsenal de virulência.

Associados a estes sinais, as alterações hematológicas e bioquímicas mais comuns são a leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda (Pretzer, 2008). Devido à cronicidade da doença, efeitos tóxicos na medula, indisponibilidade de ferro e perda de eritrócitos para o útero, poderá verificar-se uma anemia normocrômica e normocítica (Hagman, 2004).

Uma desidratação acompanhada por azotémia pré-renal, hiperproteinémia, hiperglobulinémia e hipoalbuminémia (Smith, 2006; Arnold *et al.*, 2006) e sinais de colestase, tais como hiperbilirrubinémia, hipercolesterolémia e elevados valores de fosfatase alcalina poderão eventualmente estar presentes (Fransson, 2003; Hagman, 2004).

Níveis baixos de alanina aminotransferase (ALT) associados com a inibição da síntese de enzima hepática e níveis elevados de aspartato aminotransferase (AST) podem também ocorrer (Hagman, 2004). Os níveis reduzidos de ALT parecem contrariar a hipótese de alteração hepática, podendo o aumento da enzima AST estar relacionado com destruição muscular, apresentando a enzima creatinina quinase também valores elevados (De Schepper, Van der Stock, & Capiou, 1987). No entanto, não se exclui a possibilidade desta alteração poder estar associada com alterações hepáticas associadas à endotoxémia (De Schepper *et al.*, 1987).

Na citologia do corrimento vaginal de uma cadela com piómetra poderão estar presentes neutrófilos em grande quantidade, muitas vezes degenerados, bactérias intra e extracelulares e leucocitose periférica (Pretzer, 2008).

### **Diagnóstico Imagiológico**

O diagnóstico de piómetra é facilmente confirmado com recurso à ecografia, em que se verifica um útero aumentado com conteúdo anecogénico ou hipoeecogénico. A ecografia permite ainda a distinção entre piómetra e várias afecções uterinas com acumulação de fluido (mucómetra e hemómetra) devido às diferentes ecogenicidades do fluido no interior do útero (Pretzer, 2008).

O raio-X também pode ser utilizado como método de diagnóstico, embora não tão fiável quanto a ecografia. Este pode ser inconclusivo na distinção entre piómetra, mucómetra e hemómetra e uma gravidez recente quando ainda não há mineralização fetal (gestação de menos de 40 dias) (Nelson & Couto, 2003; Arnold *et al.*, 2006; Pretzer, 2008).

### **Tratamento**

O tratamento recomendado, na maioria dos casos de piómetra, é a ovariohisterectomia (OVH), que corresponde à remoção cirúrgica do útero e dos ovários, anulando assim as hipóteses de recidiva (Fukuda, 2001). No entanto, em casos de cadelas jovens (menos de 6 anos), cadelas com interesse reprodutivo, animais em boa condição geral, piómetras com o cérvix aberto e casos sem hiperplasia quística do endométrio, o tratamento médico pode ser considerado (Arnold *et al.*, 2006; Ettinger & Feldman, 2010).

Muitas vezes, o estado geral dos animais não permite uma cirurgia sem complicações anestésicas. Nesses casos, os animais devem ser estabilizados com administração de fluidoterapia e antibioterapia de largo espectro e as funções renal e hepática devem ser avaliadas (Verstegen *et al.*, 2008; Ettinger & Feldman, 2010).

A antibioterapia deve ser instituída em todas as situações, quer seja feito tratamento cirúrgico ou médico, e deve ser prolongada até 2 semanas após OVH ou até não haver corrimento vulvar evidente, nos animais sujeitos a tratamento médico (Ettinger & Feldman, 2010). Os antibióticos devem ser escolhidos através de cultura e teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) dos microrganismos isolados do corrimento vulvar ou do conteúdo uterino (Verstegen *et al.*, 2008). No entanto, tratamento empírico deve ser realizado, até se obterem os resultados, com ampicilina, amoxicilina, ou amoxicilina e ácido clavulânico (Ettinger & Feldman, 2010).

O tratamento médico tem como principal objectivo remover o efeito da progesterona, seja por inibição da sua produção ou do seu efeito. Este pode ser feito com recurso a prostaglandinas, substâncias luteolíticas que reduzem, portanto, a concentração de

progesterona em circulação e promovem o relaxamento do cérvix, a diminuição das secreções uterinas e a contração da musculatura, provocando, assim, a expulsão do conteúdo uterino. Esta só deve ser utilizada em casos de piómetras abertas, pois a contração uterina em casos em que o cérvix se encontra encerrado pode resultar em ruptura. Efeitos secundários, tais como hipersalivação, vômito, diarreia, febre e, por vezes, alterações respiratórias (England, Freeman, & Russo, 2007), são comuns na utilização de prostaglandinas. Estes podem, no entanto, ser minimizados com a administração de atropina subcutânea e/ou realizando um protocolo de tratamento com doses baixas, inicialmente, aumentando a dose lentamente (Ettinger & Feldman, 2010). Em associação com as prostaglandinas podem ser utilizados agonistas da dopamina, tal como a bromocriptina e a cabergolina, que têm acção antiprolactínica, ou inibidores da progesterona, como a aglepristona, que competem pelos receptores de progesterona, diminuindo a acção da hormona (Ettinger & Feldman, 2010). A administração de aglepristona induz abertura do cérvix podendo, por isso, ser utilizada em casos de piómetra fechada. Normalmente, há melhorias da condição geral nas primeiras 48 horas após o início do tratamento (Gobello, Castex, Klima, Rodríguez, & Corrada, 2003; Corrada, Arias, Rodríguez, Tortora, & Gobello, 2006; England *et al.*, 2007).

Após o tratamento médico, a fertilidade da cadela poderá manter-se ou ficar diminuída. No entanto, a possibilidade de recorrência é elevada, aconselhando-se a que, no estro seguinte, a cadela seja cruzada (Nelson, Feldman, & Stabenfeldt, 1982; Meyers-Wallen, Goldschmidt, & Flickinger, 1986; Gobello *et al.*, 2003).

## II – Infecção do Tracto Urinário

### Introdução

O termo Infecção do Tracto Urinário (ITU) engloba várias entidades clínicas que se descrevem como infecções microbianas de um ou mais segmentos do tracto urinário (Senior, 2006; Kogika, 2009; Ettinger & Feldman, 2011). É uma afecção que ocorre com maior frequência em animais do sexo feminino (Ling *et al.*, 2001; Cohn, Gary, Fales, & Madsen, 2003), com uma média de idades entre os 7 e os 8 anos (Ling *et al.*, 2001; Cohn *et al.*, 2003).

A maioria das infecções ocorre de forma ascendente por microrganismos que se encontram na zona perineal ou vaginal e que contaminam a bexiga via uretra (Senior, 2006; Ettinger & Feldman, 2011; Thompson, Litster, Platell, & Trott, 2011). A infecção dos ureteres e dos rins pode ocorrer, embora seja uma situação menos frequente (Senior, 2006). Em alguns casos, pode ocorrer infecção por via hematogénica, afectando um ou ambos os rins (Féria, 2001).

A ITU pode ocorrer em animais com alterações de imunidade transitórias, auto-limitantes e potencialmente reversíveis (Kogika, 2009). Neste caso são denominadas de ITUs não complicadas, sendo esta a situação mais comum e de resposta rápida a uma antibioterapia adequada. No entanto, animais com ITUs complicadas podem ter uma falha na resposta ao tratamento, pois são infecções secundárias a alterações estruturais, neurológicas ou funcionais ou a doenças concomitantes (Féria, 2001; Nelson & Couto, 2003; Kogika, 2009). Animais com ITU associada a prostatite, urólitos, bexiga neurogénica, gravidez, diabetes mellitus ou doenças imunossupressoras, enquadram-se no grupo das ITUs complicadas (Weese *et al.*, 2011).

Animais com ITUs complicadas têm maiores hipóteses de terem também infecções recorrentes (Nelson & Couto, 2003; Kogika, 2009). Uma infecção recorrente pode dever-se a reinfecção, recidiva ou a uma infecção refractária (Weese *et al.*, 2011). Apesar da dificuldade em distinguir reinfecção e recidiva, as suas definições diferem, na medida em que a primeira designa uma nova infecção causada por um agente diferente do primeiro até 6 meses depois de um tratamento bem sucedido e a recidiva refere-se a uma infecção pelo mesmo agente num espaço de algumas semanas, após uma cultura de urina negativa pós-tratamento (Weese *et al.*, 2011). A genotipagem do agente em causa seria o método ideal para distinguir uma reinfecção de uma recidiva. No entanto, nem sempre isto é possível, o que torna a avaliação do fenótipo e do perfil de sensibilidade a antibióticos bastante útil, mas não definitiva (Weese *et al.*, 2011). Designa-se uma infecção como refractária quando, apesar de existir sensibilidade *in vitro* ao fármaco utilizado para tratamento, a urocultura exhibe resultados persistentemente positivos (Weese *et al.*, 2011).

No caso de uma recidiva ou infecção refractária, em que o agente etiológico não se altera, deve ser feita uma avaliação das causas associadas à falha do tratamento e do local exacto

da infecção, avaliando a existência de possíveis locais de sequestro das bactérias (por exemplo, a próstata) (Kogika, 2009). Quando o agente etiológico da infecção recorrente é diferente do anterior, dever-se-á ter em conta que, provavelmente, os mecanismos de defesa do animal estão comprometidos, existindo alterações estruturais e/ou funcionais ou doenças imunossupressoras (Kogika, 2009).

Em alguns casos, uma infecção por um segundo agente pode emergir aquando do tratamento da infecção inicial (Kogika, 2009). Esta designa-se por superinfecção e representa cerca de 2% das infecções (Seguin, Vaden, Altier, Stone, & Levine, 2003).

### **Etiologia e patogenia**

Os agentes etiológicos mais frequentemente associados às ITUs são as bactérias, apesar de, em certas circunstâncias, fungos e vírus também poderem infectar o tracto urinário (Nelson & Couto, 2003; Senior, 2006; Ettinger & Feldman, 2010). Das bactérias mais comumente isoladas, *E. coli* é a mais frequente (Forrester, Troy, Dalton, Huffman, & Holtzman, 1999; Ling *et al.*, 2001; Cohn *et al.*, 2003; Seguin *et al.*, 2003), podendo também isolar-se *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Streptococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* spp.. (Seguin *et al.*, 2003; Senior, 2006). A maior parte das infecções (75-79%) é causada por apenas um agente, 17 a 20% por 2 e 3 a 5% por 3 (Ling *et al.*, 2001; Ettinger & Feldman, 2011).

Uma vez que o hospedeiro tem vários mecanismos de defesa que impedem a colonização do epitélio dos órgãos que constituem o tracto urinário (uroepitélio) (Senior, 2006), para que esta ocorra é necessário que, ou estes mecanismos se encontrem disfuncionais, ou as bactérias possuam características que as permitam ultrapassá-los (Senior, 2006). A motilidade de certas bactérias e a expressão de alguns FVs poderão ser factores importantes na ascensão das mesmas pelo tracto urinário e na promoção da adesão ao epitélio. Estas condições possibilitam que as bactérias resistam ao fluxo de urina, proliferando nos intervalos entre a micção (Nelson & Couto, 2003; Senior, 2006; Ettinger & Feldman, 2011).

Para além do agente patogénico e da sua virulência, também factores do hospedeiro são essenciais na patogenia da ITU. Quando patentes, os mecanismos de defesa do hospedeiro (Tabela 1) são responsáveis por impedir a entrada de microrganismos no tracto urinário ou por eliminar os que conseguiram entrar. A micção é um destes mecanismos, que elimina cerca de 95% das bactérias não aderentes ao uroepitélio (Nelson & Couto, 2003). Também na uretra existem mecanismos de defesa, tal como o peristaltismo e, nos machos, a presença de secreções prostáticas bacteriostáticas/bactericidas (Nelson & Couto, 2003). As bactérias comensais colonizam a mucosa vulvar e prepucial, impedindo que microrganismos uropatogénicos adiram aos receptores aí existentes, produzindo também bacteriocinas

(Nelson & Couto, 2003). O pH ácido da urina e a sua elevada concentração de ureia e baixa concentração de ácidos orgânicos tornam-na bacteriostática e, por vezes, bactericida, dependendo da sua composição (Nelson & Couto, 2003).

Tabela 1 – Mecanismos de defesa do tracto urinário do hospedeiro (adaptado de Nelson & Couto, 2003)

<b>Micção normal</b>
Volume de urina normal Frequência de micção normal Reduzido volume residual de urina
<b>Estruturas anatómicas</b>
Zonas de pressão elevada na uretra Contração e peristaltismo uretral Comprimento uretral Junção vesicoureteral valvuliforme Contração e peristaltismo ureteral
<b>Barreiras na mucosa</b>
Produção de anticorpos e muco-proteína Colonização por flora comensal
<b>Propriedades antimicrobianas da urina</b>
Hiperosmolaridade Elevada concentração de ureia pH ácido
<b>Imunocompetência sistémica</b>
Imunidade celular Imunidade humoral

## Sinais clínicos e diagnóstico

A maioria dos animais que apresenta bacteriúria significativa, não exhibe qualquer sinal clínico (Forrester *et al.*, 1999; Seguin *et al.* 2003), designando-se bacteriúria subclínica (Weese *et al.*, 2011).

Nos animais sintomáticos, os sinais clínicos mais comuns são disúria, polaquiúria, estrangúria e hematória. No entanto, estes sinais não são exclusivos de uma infecção urinária e podem ocorrer associados a outra afecção (Weese *et al.*, 2011).

Sinais sistémicos, tais como letargia, depressão, anorexia, febre e leucocitose, podem verificar-se em animais com pielonefrite e/ou prostatite, sendo raros em cistites ou uretrites (Nelson & Couto, 2003). Sinais de insuficiência renal e septicemia podem também ocorrer, se houver envolvimento do tecido renal (Ettinger & Feldman, 2011). Nestes casos, ou quando existe uma doença predisponente, pode ocorrer alteração dos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Ettinger & Feldman, 2011).

O diagnóstico é feito recorrendo a urianálise e à urocultura (Kogika, 2009). A hematória, a proteinúria, a piúria e a bacteriúria são achados frequentes quando existe ITU (Weese *et al.*, 2011).

Aquando da interpretação dos resultados, deve ser tido em consideração o método de recolha de urina, já que a presença de bactérias na urina quando esta foi recolhida por métodos não assépticos, pode indicar presença de contaminantes e não necessariamente ITU (Kogika, 2009). A recolha deve ser feita, sempre que possível, por cistocentese (Nelson & Couto, 2003; Weese *et al.*, 2011). A avaliação quantitativa é importante, para determinar se a bacteriúria é, ou não, significativa (Ver Tabela 2).

Em todos os casos de infecção recorrente, deve ser realizado um hemograma e um painel bioquímico de modo a ajudar o diagnóstico de possíveis causas subjacentes (Weese *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Número de unidades formadoras de colónias por mililitro de urina consideradas significativas de acordo com o método de colheita (Adaptado de Nelson & Couto, 2003)

Método de recolha	Significativo	Duvidoso	Contaminação
Cistocentese	>1000	100 a 1000	<100
Algaliação	>10,000	1000 a 10,000	<1000
Livre ou expressão	>100,000	10,000 a 100,000	<10,000

## Tratamento

Idealmente, o tratamento deve ser instituído tendo por base um TSA. No entanto, em infecções não complicadas, questões económicas e de tempo eliminam, muitas vezes, este passo (Nelson & Couto, 2003). Assim, o tratamento empírico pode ser iniciado com ampicilina, amoxicilina, amoxicilina e ácido clavulânico, cefalosporinas, trimetoprim-sulfonamida ou enrofloxacina (Senior, 2006, Kogika, 2009; Weese *et al.*, 2011). Em ITUs recorrentes deve ser sempre feito TSA e a terapêutica inicialmente instituída deve ser adaptada consoante os resultados (Nelson & Couto, 2003; Weese *et al.*, 2011).

A antibioterapia deve ser prolongada até 14 dias em casos de infecções do tracto urinário inferior e ITUs não complicadas, podendo prolongar-se até 30 dias em animais com ITUs complicadas ou com envolvimento do tecido prostático ou renal (Senior, 2006; Weese *et al.*, 2011).

O tratamento de machos em que existe também prostatite, deve ter em conta a necessidade de utilização de um antibiótico que penetre a barreira hematoprostática, tal como, as fluoroquinolonas e trimetoprim-sulfonamidas (Senior, 2006).

Os casos de bacteriúria subclínica não têm indicação para antibioterapia, excluindo os casos em que a presença de agentes patogénicos na bexiga traga um risco elevado para infecções ascendentes ou sistémicas. No entanto, devem ser investigadas as causas para a presença desta bacteriúria (Weese *et al.*, 2011).

De forma a confirmar a eficácia do tratamento, devem ser realizadas culturas de urina, 3 a 5 dias após início do tratamento, e o sedimento urinário deve ser avaliado, 3 a 4 dias antes de descontinuada a terapêutica (Nelson & Couto, 2003). Em casos de ITU complicada, e, segundo Ettinger & Feldman (2011), também em casos de ITU não complicada, a esterilidade da urina deve ser avaliada através de urocultura, 7 dias após final do tratamento, confirmando assim o sucesso da terapêutica (Weese *et al.*, 2011). Para além da antibioterapia, as possíveis causas para a recorrência da infecção do tracto urinário devem ser investigadas e tratadas (Kogika, 2009).

As causas para uma resposta refractária ao tratamento são várias e devem ser compreendidas, para um maior sucesso terapêutico. Estas podem incluir a utilização de um fármaco, dose ou duração do tratamento não apropriados, a incapacidade do fármaco de atingir concentrações suficientes na urina, a presença de um nicho de infecção ou alterações anatómicas ou funcionais (Senior, 2006).

### III – *Escherichia coli*

#### História e características morfológicas

*Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Esta família engloba mais de 40 géneros e 180 espécies (Quinn, Markey, Carter, Donnelly, & Leonard, 2011).

Em 1885, Theodor Escherich descreveu pela primeira vez *E. coli* como *Bacterium coli commune* tendo-a isolado de fezes de recém-nascidos (Todar, 2008). Era considerada uma bactéria comensal do intestino grosso e só mais tarde, em 1935, foi demonstrado que esta seria uma bactéria potencialmente patogénica, tendo sido associada a um surto de diarreia em crianças (Todar, 2008).

São bacilos com cerca de 3 µm de comprimento (Quinn *et al.*, 2011) e possuem uma parede celular formada por duas membranas separadas por glicopeptídeos (Hirsh & Zee, 2003).

Coloniza o intestino dos mamíferos, pouco tempo após o seu nascimento (Todar, 2008; Quinn *et al.*, 2011), para além de estar presente no solo, vegetação e água (Quinn *et al.*, 2011). É a principal gram-negativa, anaeróbia facultativa que compõe a flora normal do tracto gastrointestinal de mamíferos (Hirsh & Zee, 2003).

A classificação das estirpes patogénicas pode ser feita em dois grandes grupos, consoante o local onde provocam doença: *E. coli* patogénica intestinal (*Intestinal pathogenic E. coli*, InPEC) e *E. coli* patogénica extraintestinal (*Extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC) (Russo & Johnson, 2000; Moriel *et al.*, 2012). Dentro destes dois grupos é feita uma divisão das estirpes segundo a doença que provocam (Moriel *et al.*, 2012). De entre as estirpes InPEC, causadoras de afecções caracterizadas por diarreia, encontram-se a *E. coli* enteropatogénica (*Enteropathogenic E. coli*, EPEC), a *E. coli* enterotoxigénica (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC), a *E. coli* enterohemorrágica (*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC), a *E. coli* enteroagregativa (*Enteroadgregative E. coli*, EAEC), a *E. coli* enteroinvasiva (*Enteroinvasive E. coli*, EIEC) e a *E. coli* aderente invasiva (*Adherent-invasive E. coli*, AIEC) (Moriel *et al.*, 2012). As estirpes ExPEC, que provocam doença fora do tracto intestinal, são normalmente associadas a sepsis (*Sepsis-associated E. coli*, SEPEC), infecções do tracto urinário (*Uropathogenic E. coli*, UPEC) e meningites (*Neonatal meningitis-associated E. coli*, NMEC) (Siqueira *et al.*, 2009; Moriel *et al.*, 2012). Especificamente em animais, *E. coli* patogénica aviária (*Avian pathogenic E. coli*, APEC) provoca infecções sistémicas e no tracto respiratório (Garénaux, Caza, & Dozois, 2011). As estirpes isoladas em casos de piómetra têm características semelhantes às UPEC, provavelmente devido a terem uma origem comum (Chen *et al.*, 2003).

Estudos filogenéticos distribuem *E. coli* por 4 grupos principais: A, B1, B2 e D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). As estirpes ExPEC pertencem, normalmente, aos grupos filogenéticos

B2 e D (Picard *et al.*, 1999; Johnson & Stell, 2000), enquanto as estirpes comensais extraintestinais pertencem, na maioria, aos grupos filogenéticos A e B1 (Bingen *et al.*, 1998; Duriez *et al.*, 2001). Pelo contrário, as InPEC pertencem, maioritariamente, aos grupos filogenéticos A, B1 e D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004).

Em geral, as estirpes dos grupos B2 e D são consideradas mais patogénicas e possuem mais FVs do que as dos grupos A e B1 (Bingen *et al.*, 1998; Boyd & Hartl, 1998; Picard *et al.*, 1999; Johnson & Stell, 2000; Duriez *et al.*, 2001; Johnson, Delavari, Kuskowski, & Stell, 2001; Tramuta, Nucera, Robino, Salvarani, & Nebbia, 2011)

### **Factores de virulência de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* possui FVs que intervêm em diferentes etapas da infecção e, desta forma, facilitam a colonização, a proliferação e a sua persistência no hospedeiro (Peterson, 1996). Os genes que codificam para estes factores podem localizar-se no cromossoma, em plasmídeos, transposões ou bacteriófagos (Peterson, 1996). As adesinas, os sideróforos, as toxinas, a cápsula e as protectinas são exemplos destes FVs (Quinn *et al.*, 2011). O número de FVs existentes é bastante diverso, sendo que apenas alguns deles se descreverão, seguidamente.

### **Adesinas**

*Escherichia coli* pode apresentar, na sua superfície, diversas estruturas que permitem à bactéria aderir às células do hospedeiro facilitando a colonização (Quinn *et al.*, 2011). Este tipo de estruturas medeia a adesão das bactérias às células do hospedeiro, através de ligação específica a receptores presentes nos tecidos (Nishikawa & Baba, 1985). Estas estruturas podem ser fímbrias (ou *pili*), que são estruturas proteicas filamentosas ou adesinas afimbriais que se encontram na membrana externa (Bower, Eto, & Mulvey, 2005). As fímbrias podem ser de vários tipos, consoante as moléculas das suas subunidades (*pilina*) e da sua organização (Hirsh & Zee, 2003). Distinguem-se, entre outras, as fímbrias tipo 1, as fímbrias P e as fímbrias S. As adesinas mais comuns são as fímbrias tipo 1 que estão presentes em mais de 90% das estirpes de *E. coli*, seguidas das fímbrias P (40 a 60%), das fímbrias S (30 a 60%) e, por último, das adesinas afimbriais (0 a 12,5%) (Blanco *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 2002)

Algumas destas adesinas, para além de proporcionarem a adesão das bactérias, permitem ainda a sua entrada nas células epiteliais do hospedeiro, nos mastócitos e nos macrófagos (Bower *et al.*, 2005) e provocam hemaglutinação. Esta hemaglutinação pode ser manose resistente (HAMR) (fímbrias S e P e adesinas Afa), ou manose sensível (HAMS) (fímbrias tipo 1) (Blanco *et al.*, 1997; Yuri, Nakata, Katae, Yamamoto, & Hasegawa, 1998). As fímbrias F1C não provocam hemaglutinação (Klemm, Ørskov, & Ørskov, 1982). A adesão das

bactérias às células do hospedeiro parece, em certos casos, ser essencial para o desenvolvimento de doença. No entanto, a acção das adesinas resulta numa estimulação da produção de mediadores inflamatórios (Hedlund *et al.*, 1999; Dodson *et al.*, 2001; Schilling, Mulvey, Vincent, Lorenz, & Hultgren, 2001a) o que poderá ser contraproducente.

As fímbrias tipo 1 são estruturas helicoidais compostas por repetições da subunidade FimA, pelas proteínas FimF e FimG e pela adesina FimH que é codificada pelo gene *fimH* (Schilling, Mulvey, & Hultgren, 2001b; Sokurenko, Courtney, Ohman, Klemm, & Hasty, 1994; Bower *et al.*, 2005). Este tipo de fímbrias liga-se a proteínas com manose que se podem encontrar em eritrócitos de várias espécies, nas células tubulares proximais do rim, epitélio bucal, vesical, vaginal, pulmonar e intestinal e várias células inflamatórias (Johnson, 1991; Jones *et al.*, 1995).

As fímbrias P são importantes na colonização do tracto urinário por *E. coli* (Féria, Machado, Correia, Gonçalves, & Gastra, 2001). Estas fímbrias são codificadas pelo operão *pap* (*pyelonephritis-associated pili*) que contém 11 genes, 6 dos quais codificam proteínas estruturais da fímbria (Blanco *et al.*, 1997; Bergsten, Wullt, & Svanborg, 2005). São estruturas helicoidais formadas por repetições de subunidades PapA ligadas numa extremidade às pilinas, PapK, PapE, PapF e PapG, sendo a última a adesina propriamente dita, e unidas à bactéria através da pilina PapH (Jacob-Dubuisson, Heuser, Dodson, Normark, & Hultgren, 1993; Dodson *et al.*, 2001). A adesina PapG liga-se à galabiose presente em determinados glicosfingolípidos (Salminen *et al.*, 2007). Estes últimos encontram-se nas membranas celulares de eritrócitos e de células epiteliais do tracto urinário (Leffler & Svanborg-Edén, 1981; Breimer, Hansson, & Leffler, 1985). Existem 3 alelos da adesina PapG (classe I, II e III) que possuem especificidades diferentes para os vários isotipos do seu receptor. A especificidade dos alelos e a distribuição diferencial dos isotipos do receptor explica as diferenças na adesão das fímbrias P em diferentes espécies e tecidos (Dodson *et al.*, 2001).

Outro tipo de fímbrias, as fímbrias S, é associado a casos de meningite, infecção do tracto urinário e sepsis em humanos (Korhonen *et al.*, 1985; Marre, Hacker, Henkel, & Goebel, 1986; Maiti, Harel, & Fairbrother, 1993). As 4 proteínas que estruturam as fímbrias S (SfaA, SfaG, SfaS e SfaH) são codificadas no operão *sfa* (Marre, Kreft, & Hacker, 1990; Ott & Hacker, 1991; Maiti *et al.*, 1993). Tanto a subunidade SfaA como a SfaS têm propriedades adesivas. SfaA é a subunidade mais representada na fímbria e liga-se a glicolípidos e plasminogénio de células endoteliais e SfaS liga-se ao ácido siálico presente nas células epiteliais renais e endotélio vascular (Korhonen *et al.*, 1986; Prasadarao, Wass, Hacker, Jann, & Kim, 1993).

O agrupamento de genes que codifica as fímbrias S é bastante semelhante ao que codifica as fímbrias F1C (*foc*), no entanto os receptores para ambas as fímbrias não são os mesmos

(Riegman *et al.*, 1990). As fímbrias F1C ligam-se ao epitélio dos túbulos distais e ductos colectores e ao endotélio vascular através do reconhecimento da porção GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$  de determinados glicolípidos (Virkola *et al.*, 1988; Khan *et al.*, 2000). Estas fímbrias são constituídas por uma subunidade mais representativa, a FocA e 3 outras subunidades menores: FocF, FocG e FocH (Khan *et al.*, 2000).

Para além das referidas adesinas localizadas em fímbrias, existe também a família de adesinas Dr que inclui as adesinas afimbriais AFA (Wroblewska-Seniuk *et al.*, 2005). Esta família de adesinas produz HAMR de eritrócitos humanos, ligando-se ao receptor Dr, constituinte da proteína CD55 (Labigne-Roussel, Lark, Schoolnik, & Falkow, 1984; Nowicki, Truong, Moulds, & Hull, 1988; Nowicki *et al.*, 1990; Le Bouguéneec *et al.*, 2001). Estes receptores encontram-se no cólon e no tracto urinário (Wroblewska-Seniuk *et al.*, 2005) sendo, por isso, normalmente, associadas a infecções do tracto urinário (pielonefrite) e infecções intestinais em humanos (Germani, Bégau, Duval, & Le Bouguéneec, 1996; Le Bouguéneec *et al.*, 2001). Os operões que codificam as adesinas pertencentes a esta família têm organizações genéticas semelhantes, contendo genes (*afaA*, *afaB*, *afaC* e *afaD*, no caso das adesinas Afa) com elevada homologia (Wroblewska-Seniuk *et al.*, 2005). No entanto, o gene *afaE* que codifica a adesina propriamente dita é muito variável, permitindo a distinção de várias adesinas AFA (Labigne-Roussel & Falkow, 1988; Le Bouguéneec *et al.*, 1993; Wroblewska-Seniuk *et al.*, 2005). Dois destes subtipos, AfaE-VII e AfaE-VIII são especificamente associados a estirpes de *E. coli* patogénicas em animais (Lalioui, Jouve, Gounon, & Le Bouguéneec, 1999). A AfaE-VII produz HAMR de eritrócitos humanos, bovinos e porcos e liga-se às células epiteliais de humanos e bovinos (Lalioui *et al.*, 1999). O receptor da AfaE-VIII não foi identificado, mas esta parece estar associada a casos de diarreia, septicemia e infecção de órgãos internos, sendo a porta de entrada o intestino (Lalioui *et al.*, 1999). Em estudos *in vitro* conseguiu perceber-se que esta se liga ao epitélio do tracto urinário e a células renais de cães (Nagy, Tóth, & Fekete, 2005).

### **Sistemas de captação de ferro**

Vários nutrientes são importantes para o desenvolvimento dos microrganismos, entre eles, o ferro. Este é essencial, incorporando proteínas (Andrews, Robinson, & Rodríguez-Quiñones, 2003) e participando em processos como o transporte de oxigénio e a síntese de ADN (Skaar, 2010). No hospedeiro, nem sempre se encontra disponível na sua forma livre, apresentando-se ligado a proteínas como a ferritina, a transferrina, a lactoferrina e o grupo heme (Ratledge & Dover, 2000; Skaar, 2010). É, por isso, importante a presença de mecanismos que permitam às bactérias adquirir ferro. Entre os sistemas descritos, encontramos os sideróforos e os transportadores de ferro (Andrews *et al.*, 2003).

Os sideróforos são moléculas com grande afinidade para o ferro que o removem das proteínas transportadoras, disponibilizando-o (Ratledge & Dover, 2000; Hirsh & Zee, 2003; Quinn *et al.*, 2011). Existem vários sideróforos já caracterizados como a enterobactina, as salmoquelinas, a aerobactina e a yersiniabactina.

Um dos principais mecanismos de tomada de ferro pela *E. coli* é a enteroquelina ou enterobactina. Esta consegue retirar o ferro ligado à transferrina, por ter uma maior afinidade para este ião (Ratledge & Dover, 2000). Na verdade, a enterobactina é o sideróforo conhecido com a maior constante de estabilidade para o ferro (Ratledge & Dover, 2000; Bister *et al.*, 2004). Apesar disso, é também conhecida a sua ligação a proteínas como a albumina e a lipocalina 2 (Williams & Carbonetti, 1986). Esta ligação às proteínas afecta a sua eficiência como sideróforo. Como método de ludibriar as defesas do hospedeiro, *E. coli* consegue modificar a enterobactina para impedir que a mesma seja sequestrada pela albumina e pela lipocalina 2 (Fischbach *et al.*, 2006; Garénaux *et al.*, 2011), dando origem a produtos glicosilados chamados salmoquelinas (Bister *et al.*, 2004). Existem três tipos de salmoquelinas: enterobactina monoglicosilada (MGE), enterobactina diglicosilada (DGE) e enterobactina triglicosilada (TGE) (Garénaux *et al.*, 2011), sendo a produção destas moléculas uma das principais características das UPEC (Valdebenito, Bister, Reissbrodt, Hantke, & Winkelmann, 2005; Hagan, 2009). De facto, o receptor das salmoquelinas, IroN, contribui para a colonização do tracto urinário e a invasão das células do uroepitélio (Russo *et al.*, 2002; Feldmann, Sorsa, Hildinger, & Schubert, 2007).

Algumas bactérias produzem também aerobactina, principalmente em casos de pielonefrite e prostatite (Ørskov, Edén, & Ørskov, 1988; Johnson *et al.*, 2005). Esta, ao contrário da enterobactina e das salmoquelinas, não é hidrolisada intracelularmente para libertar o ferro e pode ser novamente excretada (Williams & Carbonetti, 1986). Pensa-se que o seu papel é o de obter ferro a partir da ferritina dos macrófagos e outras células (Brock, Williams, Licéaga, & Wooldridge, 1991).

Os genes que codificam as proteínas ligadas à yersiniabactina estão localizados numa “*high pathogenicity island*” (Schubert, Rakin, Karch, Carniel, & Heesemann, 1998; Rakin, Noelting, Schubert, & Heesemann, 1999). Esta ilha está amplamente difundida por várias estirpes de *E. coli*, sendo, no entanto, mais comum em estirpes de UPEC e EAEC (Valdebenito *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 2009).

Outros sistemas de captação de ferro pelas bactérias incluem transportadores de metais (Andrews *et al.*, 2003). Um exemplo é o grupo de proteínas SitABCD que participa no transporte tanto de ferro como de manganésio. Pensa-se que este sistema tenha maior afinidade para o manganésio, não sendo actualmente considerada como função primária o transporte de ferro (Kehres, Janakiraman, Slauch, & Maguire, 2002).

Existem também receptores de membrana para proteínas do hospedeiro que transportam ferro. É o caso do grupo heme e dos receptores codificados pelo gene *chuA* do *locus chu* (Hoffmann, Hornef, Schubert, & Roggenkamp, 2001). As bactérias possuem assim uma forma de adquirir ferro, directamente, através deste grupo onde se encontra a maior parte do ferro no organismo hospedeiro (Torres, Redford, Welch, & Payne, 2001). Este gene é significativamente mais prevalente em estirpes de UPEC do que em estirpes comensais (Hagan, 2009).

Uma só estirpe pode ter vários tipos de sistemas de captação de ferro. Uma vez que cada um pode ser influenciado por diferentes estímulos externos tais como o pH, e porque as proteínas das quais adquirem o ferro diferem, esta pode ser uma vantagem desenvolvida para sobreviver em diferentes meios e aumentar a sua eficiência (Valdebenito, Crumbliss, Winkelmann, & Hantke, 2006).

A captação de ferro pelas bactérias está dependente de vários processos: a síntese dos sideróforos, a sua excreção, o reconhecimento, na membrana externa da bactéria, do sideróforo já ligado ao ferro, a internalização deste complexo e a libertação do ferro no citoplasma celular (Garénaux *et al.*, 2011). Estes processos ocorrem através da acção de diferentes proteínas (Tabela 3). No entanto, ainda não foram esclarecidos os mecanismos que levam à excreção da aerobactina e da yersiniabactina e à libertação do ferro da yersiniabactina (Garénaux *et al.*, 2011).

Tabela 3 – Proteínas associadas à síntese (S), excreção (E), reconhecimento (R), internalização (I) e libertação do ferro (L) dos diferentes sideróforos.

	S	E	R	I	L
Enterobactina	EntABCDEF	EntS TolC	FepA	FepBCDG	Fes
Salmoquelinas	EntABCDEF + IroB	IroC (DGE,TGE) EntS (MGE)	IroN	FepBCDG	IroD
Aerobactina	IucABCD	?	IutA	FhuBCD	Reductases
Yersiniabactina	YbtSEUT + Irp1, Irp2	?	FyuA	YbtPQ	?

## Toxinas

Outros FVs com um papel importante na patogenia das doenças provocadas por *E. coli* são as toxinas, tais como a hemolisina, o factor necrosante citotóxico (CNF) e os antigénios O. A hemolisina e o CNF são as principais toxinas associadas a estirpes de ExPEC (Beutin, 1999; Siqueira *et al.*, 2009).

*Escherichia coli* produz dois factores necrosantes citotóxicos, denominados CNF-1 e CNF-2. Estas duas proteínas afectam células eucariotas e impedem a sua divisão, sem inibir a replicação de ácidos nucleicos, o que origina células multinucleadas (Brito, Vidotto, Berbel, & Tagliari, 2004). O CNF-1, codificado pelo gene *cnf1*, liga-se à superfície celular e sofre endocitose mediada por um receptor, entrando na célula e atingindo, posteriormente, o citosol (Contamin *et al.*, 2000; Boquet, 2001). Aí, interfere com as proteínas que regulam a organização e dinâmica do citosqueleto entre outros processos que envolvem a actina (Fabbri, Travaglione, & Fiorentini, 2010).

Esta toxina interfere com a fagocitose, aumentando a internalização das bactérias pelas células hospedeiras (Fiorentini *et al.*, 1997; Doye *et al.*, 2002) e provoca edema da submucosa e a apoptose das células epiteliais da bexiga, o que permitirá à *E. coli* atingir camadas celulares que, normalmente, não estão expostas (Mills, Meysick, & O'Brien, 2000; Smith, Rasmussen, Grande, Conran, & O'Brien, 2008). Por outro lado, o CNF-1 tem também a capacidade de impedir a apoptose, o que poderá conferir alguma protecção às bactérias fagocitadas (Fiorentini *et al.*, 1997). Em casos de piómetra, os úteros infectados por estirpes produtoras de CNF-1 apresentam uma maior reacção inflamatória e lesões histológicas mais graves (Dhaliwal, Wray, & Noakes, 1998; Nelson & Couto, 2003).

A hemolisina é uma toxina que forma poros transmembranares nas células do hospedeiro provocando a lise, o que permite à bactéria um acesso aos nutrientes celulares. Entre estas células encontram-se os eritrócitos e células do sistema imunitário (Johnson, 1991; Jonas, Schultheis, Klas, Krammer, & Bhakdi, 1993). Para além da lise e necrose celular, esta toxina é capaz de inibir a fagocitose e a quimiotaxia e induzir a apoptose de células do hospedeiro e a esfoliação do epitélio da bexiga (Johnson, 1991; Jonas *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Smith, Grande, Rasmussen, & O'Brien, 2006; Smith *et al.*, 2008; Todar, 2008).

Existem vários tipos de hemolisina, sendo que algumas (por exemplo, a  $\alpha$ -hemolisina) são excretadas e outras, como a  $\beta$ -hemolisina, se encontram fixas à célula bacteriana (Johnson, 1991). A  $\alpha$ -hemolisina é uma lipoproteína que está principalmente associada a infecções do tracto urinário superior (Johnson, 1991). É codificada pelo operão *hly* que é composto por 4 genes (*hlyA-D*) (Goebel & Hedgpeth, 1982), correspondendo a proteína HlyA à parte estrutural da toxina e estando as restantes proteínas envolvidas na sua activação (HlyC) e

excreção (HlyB e HlyD) (Welch & Falkow, 1984; Nicaud, Mackman, Gray, & Holland, 1985; Johnson, 1991).

Os antígenos O são constituídos por repetições de polissacarídeos (polissacarídeo O) (Raetz & Whitfield, 2002) e constituem, juntamente com um núcleo de oligossacarídeos e o lípido A, o LPS ou endotoxina, que integra a membrana externa das bactérias gram-negativas (Quinn *et al.*, 2011). O LPS é um factor importante na virulência de *E. coli*, devido, não só, ao carácter tóxico do lípido A (Hirsh & Zee, 2003), mas também ao antígeno O do qual se presume que a principal função seja evitar as defesas do hospedeiro (Raetz & Whitfield, 2002).

### **Outros**

A cápsula é a estrutura externa que compõe a maior parte da parede celular e onde se localizam os antígenos K (Hirsh & Zee, 2003). Estes são polissacarídeos que impedem a ligação de anticorpos e de proteínas do sistema complemento à bactéria. Para além disso, diminuem a capacidade de reconhecimento e fagocitose pelas células do hospedeiro (Todar, 2008).

O antígeno flagelar tem natureza proteica e encontra-se, tal como o nome indica, nos flagelos (Quinn *et al.*, 2011). Os flagelos são estruturas que conferem motilidade à bactéria e que, no caso da maioria das *E. coli*, se distribuem em torno de toda a bactéria (flagelos peritricos) (Hirsh & Zee, 2003).

Kurazono *et al.* (2000) referiu a existência de uma proteína especificamente associada a todas as manifestações de infecções do tracto urinário que conferia a *E. coli* uma maior capacidade de provocar infecção (Yamamoto *et al.*, 2001). A proteína específica uropatogénica (*Uropathogenic-specific protein*, Usp) é codificada pelo gene *usp* e pensa-se que possa ter a função de bacteriocina (Yamamoto *et al.*, 2001; Parret & De Mot, 2002).

Para além da sua associação a casos de cistite em humanos, Siqueira *et al.* (2009) mostrou a associação desta proteína também a casos de cistite e piómetra em cadelas.

### **Ilhas de patogenicidade**

Os FVs expressos por *E. coli* estão muitas vezes agrupados em grandes regiões genómicas (10-200 kb) denominadas “Ilhas de patogenicidade” (*pathogenicity associated islands*, PAIs). Estas ilhas apresentam um conteúdo em guanina e citosina diferente do restante ADN da bactéria, estão adjacentes a genes de ácido ribonucleico transportador (ARNt) e possuem genes de mobilidade (Guyer, Gunther, & Mobley, 2001). Estas características permitem às PAIs serem transferidas horizontalmente entre estirpes de *E. coli* diferentes dando origem a uma diversidade genética bastante grande (Oelschlaeger, Dobrindt, & Hacker, 2002). Outra das características das PAIs é o facto de serem elementos instáveis e com propensão para

sofrer deleções (Hacker, Blum-Oehler, Mühldorfer, & Tschäpe, 1997; Middendorf *et al.*, 2004).

Foram já identificadas várias PAIs nas estirpes uropatogénicas de *E. coli* 536, J96 e CFT073, das quais as mais estudadas são 4 das ilhas da estirpe 536 (PAI I<sub>536</sub>, PAI II<sub>536</sub>, PAI III<sub>536</sub> e PAI IV<sub>536</sub>), 2 da estirpe J96 (PAI I<sub>J96</sub> e PAI II<sub>J96</sub>) e 2 da estirpe CFT073 (PAI I<sub>CFT073</sub> e PAI II<sub>CFT073</sub>). Entre estas, a PAI IV<sub>536</sub> é a mais prevalente, tanto em UPEC como em estirpes comensais, sendo a PAI I<sub>J96</sub> a menos frequente (Sabaté, Moreno, Pérez, Andreu, & Prats, 2006). Os FVs codificados em cada uma das PAIs encontram-se na Tabela 4 (Swenson, Bukanov, Berg, & Welch, 1996; Guyer, Kao, & Mobley, 1998; Rasko, Phillips, Li, & Mobley, 2001; Dobrindt *et al.*, 2002; Oelschlaeger *et al.*, 2002; Seshasayee, 2009).

Tabela 4 – Factores de virulência codificados nas ilhas de patogenicidade.

PAI	Factores de virulência
I <sub>536</sub>	Hemolisina- $\alpha$ , Fímbrias tipo-F17, Fímbrias tipo-CS12
II <sub>536</sub>	Hemolisina- $\alpha$ , Fímbrias relacionadas com as P, adesinas Hek, adesinas tipo-hemaglutininas
III <sub>536</sub>	Fímbrias S, Salmoquelina, Receptor heme, Protease de hemoglobina tipo-Tsh, Adesina Sap
IV <sub>536</sub>	Yersiniabactina
I <sub>J96</sub>	Hemolisina- $\alpha$ , Fímbrias P
II <sub>J96</sub>	Hemolisina- $\alpha$ , Fímbrias Prs, CNF-1
I <sub>CFT073</sub>	Hemolisina- $\alpha$ , Fímbrias P, toxina autotransportadora secretada (sat), aerobactina, antígeno 43, receptor de enterobactina/adesina ( <i>iha</i> )
II <sub>CFT073</sub>	Fímbrias P

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Caracterização da população**

Foram analisados 80 isolados de *E. coli*, tendo, 23 desses isolados, sido obtidos a partir de amostras de urina de cadelas com infecção do tracto urinário inferior (cistite) provocada apenas por *E. coli* (n=20) e por *E. coli* e *Proteus* sp. (n=3). O diagnóstico de cistite baseou-se na bacteriúria significativa ( $\geq 10^5$  ufc/ml de urina) e nos sinais clínicos apresentados pela cadela. Os 23 animais distribuíram-se por 12 raças diferentes (7 de raça indeterminada), com idades compreendidas entre os 5 meses e os 14 anos (idade média de 7 anos). Trinta e um isolados foram obtidos a partir do conteúdo uterino de 28 cadelas em diestro com diagnóstico de piómetra. O diagnóstico de piómetra foi feito com base na fase do ciclo éstrico em que a cadela se encontrava (diestro), nos sinais clínicos e nos resultados hematológicos e ecográficos. O conteúdo intra-uterino foi recolhido após ovariectomia, tendo sido somente isolada *E. coli*. Foram recolhidas amostras de animais de 11 raças diferentes (7 de raça indeterminada), com idades entre os 4 e os 16 anos (idade média de 9,7 anos).

Os restantes 26 isolados, foram obtidos a partir de zaragoas rectais de cadelas saudáveis que foram apresentadas a consultas de rotina. As cadelas encontravam-se em estro ou diestro, o que foi confirmado através de citologia vaginal.

### **Isolamento e identificação**

As zaragoas fecais e do conteúdo uterino foram inoculadas em dois meios sólidos: Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (PB5039A, OXOID Deutschland GmbH) (COS) e Agar McConkey (610028, Liofilchem Italy), e num meio líquido: Brain Heart infusion Broth (BHiB) (610008, Liofilchem Italy), sendo, posteriormente, incubados a 37°C durante 24 horas. A partir do meio de McConkey, apenas se isolaram, para COS, colónias lactose positivas (coloração rosa) com um halo translúcido em seu torno. Em COS as colónias de *E. coli* apresentam um aspecto acinzentado, mais ou menos mucóide e grandes dimensões. A confirmação da pureza e a identificação da morfologia da cultura foi efectuada através da coloração diferencial de Gram. Posteriormente, foi efectuada o teste da oxidase (Bactident Oxidase, 1.13300.0001, Merck KGaA Darmstadt, Germany) e uma galeria IMViC (Simmons Citrate Agar, CM155, OXOID Ltd. Basingstoke, Hampshire, England; MR-VP Broth, 610032, Liofilchem, Italy; SIM Medium, 1.05470, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a qual permitiu uma identificação presuntiva de *E. coli*.

Posteriormente, foi ainda efectuada PCR para o gene 16S do ARN ribossomal (ARNr) de *E. coli*, em todos os isolados, de acordo com as condições descritas por Chen *et al.* (2003). Os isolados foram armazenados a -80°C em criotubos com BHI e 30% de glicerol.

### **Análise do fenótipo hemolítico e mucóide**

Os fenótipos das colónias (não mucóide, mucóide, não hemolítico, hemolítico) foram avaliados nas placas de COS após incubação a 37°C durante 24 horas.

O fenótipo mucóide/não mucóide foi avaliado através da observação macroscópica do aspecto mucóide das colónias crescidas nas placas de COS.

A actividade hemolítica associada à expressão da  $\alpha$ -hemolisina foi avaliada pela formação de um halo de hemólise clara à volta das colónias crescidas nas placas de COS.

### **Estirpes de referência**

A estirpe *E. coli* 536 (positiva para as PAIs I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub>, IV<sub>536</sub> e II<sub>CFT073</sub>) (gentilmente cedida por A. Andreu do Departamento de Microbiologia do Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Espanha), *E. coli* ATCC 25922 (positiva para os genes *focG*, *usp*, *fepA*, *sitA*, *iroN*, *gadA*, *chuA* e *yjaA* e o fragmento de ADN TspE4-C2), *E. coli* KS52 (positiva para os genes *iucD* e *afaBC*) e *E. coli* J96 (positiva para as PAIs I<sub>CFT073</sub>, II<sub>CFT073</sub>, I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, IV<sub>536</sub>, I<sub>J96</sub> e II<sub>J96</sub> e para os genes *fimH*, *hlyA*, *cnf1*, *sfa/focDE*, *papEF*, *chuA*, *yjaA* e para o fragmento de ADN TspE4-C2) foram utilizadas como controlo positivo nas reacções de PCR para detecção dos marcadores de PAIs, dos genes que codificam para FVs e/ou determinação do grupo filogenético.

### **Extracção de ADN**

A extracção de ADN foi realizada por uma técnica rápida de fervura, a qual permitiu a obtenção simultânea de ADN cromossómico e ADN plasmídico (Féria, 2001).

A partir dos isolados guardados nos criotubos, fez-se novamente a propagação destes em COS (37°C, durante a noite), tendo-se, posteriormente, repicado uma única colónia isolada para 2 ml de *Trypticase Soy Broth* (TSB) e incubado a 37°C, durante a noite. Após incubação, 2 ml do inóculo foram centrifugados (13.000 rpm, 8 minutos) e o sedimento ressuspenso em 500  $\mu$ L de água desionizada estéril. Foi feita nova centrifugação (13.000 rpm, 3 minutos), sendo o sedimento ressuspenso em 100  $\mu$ L de água desionizada estéril e, posteriormente, incubado durante 15 minutos a 100°C. Após centrifugação (13.000 rpm, 8 minutos), o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C até posterior utilização.

### **Identificação de ilhas de patogenicidade e dos genes que codificam para factores de virulência**

A presença de 8 PAIs características de UPEC foi avaliada por PCR convencional, utilizando sequências de oligonucleotídeos (Tabela 5) para marcadores específicos de cada ilha previamente descrita (Sabaté *et al.*, 2006). A amplificação dos 8 fragmentos específicos de cada PAI foi efectuada através de 3 reacções de PCR-multiplex distintas (A, B1 e B2), de

acordo com o descrito por Sabaté *et al.* (2006) e, posteriormente, por Bronowski *et al.* (2008). O Multiplex A foi efectuado de acordo com as condições descritas por Sabaté *et al.* (2006) e permitiu amplificar os marcadores da PAI III<sub>536</sub>, PAI IV<sub>536</sub> e PAI II<sub>CFT073</sub>. Nesta reacção, foram utilizados 25 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x PCR buffer (Promega), 0,5 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 4U de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores: 0,5 µM dos pares sfaA1.1/sfaA1.2 (Thermo Fisher Scientific) e IRP2.FP/IRP2.RP (Thermo Fisher Scientific) e 0,7 µM do par cft073.2Ent1/cft073.2Ent2 (Thermo Fisher Scientific). Para cada reacção foram utilizados 4 µL de ADN, num volume final de reacção de 50 µL. As estirpes *E. coli* J96 (positiva para PAI II<sub>CFT073</sub> e PAI IV<sub>536</sub>) e *E. coli* 536 (positiva para PAI III<sub>536</sub>, PAI IV<sub>536</sub> e PAI II<sub>CFT073</sub>) foram utilizadas como controlo positivo para esta reacção e, como controlo negativo, utilizou-se uma reacção à qual não foi adicionada ADN. O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação de 94°C, durante 5 minutos, seguido por 31 ciclos de 94°C, durante 1 minuto, hibridação a 55°C, durante 1 minuto, extensão, durante 2 minutos, a 72°C e um passo final de 10 minutos, a 72°C (Doppio Thermal Cycler, VWR; MJ Mini Personal Thermal Cycler, Biorad). As amostras foram posteriormente corridas num gel de agarose 2% corado com brometo de etídio a 1% (5 µl/100 ml) e fotografadas sob transiluminação UV (Pharmacia Biotech, Thermal Imaging System FTI-500). Para identificação de pesos moleculares das bandas foi utilizado um marcador (HyperLadder II, Bionline) corrido no mesmo gel.

O Multiplex B, originalmente descrito por Sabaté *et al.* (2006), foi dividido em duas reacções (B1 e B2) segundo Bronowski *et al.* (2008) amplificando o Multiplex B1 o marcador das ilhas II<sub>J96</sub> e I<sub>536</sub> e o Multiplex B2 o das ilhas II<sub>536</sub>, I<sub>CFT073</sub> e I<sub>J96</sub>. Para ambos os Multiplex B foram utilizados 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x PCR buffer (Promega), 0,12 mM de dNTPs, 1,5U de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), 300 nM de cada um dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores: hlyd/cnf e I.9/I.10 (Thermo Fisher Scientific) para o Multiplex B1 e orf1up/orf1down, papGI<sub>f</sub>/papGI<sub>r</sub> e RPAi/RPA<sub>f</sub> (Thermo Fisher Scientific) para o Multiplex B2. Para cada reacção, foram utilizados 2,5 µL de ADN, num volume final de reacção de 25 µL. As estirpes de *E. coli* J96 e 536 foram utilizadas como controlos positivos, sendo a J96 positiva para todas as PAIs amplificadas por ambas as reacções e a 536 positiva para a PAI I<sub>536</sub> e PAI II<sub>536</sub>. O procedimento de amplificação consistiu, para ambos, num passo inicial de desnaturação de 94°C, durante 5 minutos, 31 ciclos de 94°C, durante 1 minuto, hibridação a 60°C, durante 1 minuto e extensão, durante 2 minutos, a 72°C e um passo final de 72°C durante 10 minutos (Doppio Thermal Cycler, VWR; MJ Mini Personal Thermal Cycler, Biorad). As amostras das duas reacções (B1 e B2) foram corridas em simultâneo com um marcador de pesos moleculares (DNA Ladder 1kb, Promega) num gel

de agarose de 0,8% corado com brometo de etídio 1% (5 µl/100 ml) e fotografadas sob trans-iluminação UV (Pharmacia Biotech, Thermal Imaging System FTI-500).

Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para os marcadores das PAIs em estudo, PAIs alvo, temperaturas de hibridação (TH) utilizadas na reacção de PCR e tamanhos dos fragmentos amplificados (Adaptado de Bronowski *et al.*, 2008)

Oligo. iniciador	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	PAI alvo	Tamanho (bp)	TH (°C)
sfaAI.1	CGGGCATGCATCAATTATCTTTG	PAI III <sub>536</sub>	161	55
sfaAI.2	TGTGTAGATGCAGTCACTCCG			55
IRP2 FP	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	PAI IV <sub>536</sub>	285	55
IRP2 RP	TCGTCTGGGCAGCGTTTCTTCT			55
cft073.2Ent1	ATGGATGTTGTATCGCGC	PAI II <sub>CFT073</sub>	420	55
cft073.2Ent2	ACGAGCATGTGGATCTGC			55
I.9	TAATGCCGGAGATTCATTGTC	PAI I <sub>536</sub>	1801	60
I.10	AGGATTTGTCTCAGGGCTTT			60
orflup	CATGTCCAAAGCTCGAGCC	PAI II <sub>536</sub>	1041	60
orflown	CTACGTCAGGCTGGCTTTG			60
papGI <sub>f</sub>	TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT	PAI I <sub>J96</sub>	461	60
papGI <sub>r</sub>	TGGCATCCCCCAACATTATCG			60
hlyd	GGATCCATGAAAACATGGTTAATGGG	PAI II <sub>J96</sub>	2409	60
cnf	GATATTTTTGTTGCCATTGGTTACC			60
RPAi	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	PAI I <sub>CFT073</sub>	930	60
RPAf	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC			60

Para além das PAIs, foi ainda avaliada a presença de genes que codificam para FVs: adesinas (*fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *sfaS*, *focG* e *afaBC*), toxinas (*hlyA* e *cnf1*), sistemas de captação de ferro (*fepA*, *sitA*, *iroN*, *fyuA* e *iucD*) e a proteína específica uropatogénica (*usp*). A presença dos genes *iucD*, *hlyA*, *papEF*, *sfa/focDE*, *afaBC* e *cnf1* foi testada em PCR-multiplex (Multiplex 1). As condições de cada reacção de PCR, as sequências de oligonucleotídeos iniciadores, tamanhos esperados dos fragmentos amplificados e estirpes de referência utilizadas como controlo positivo (C+) estão descritas na Tabela 6. As reacções de PCR para a detecção dos genes *fyuA* e *sfaS* tiveram como controlos positivos as estirpes Pyo29 e UTI134, respectivamente, cujos produtos de PCR, do tamanho molecular esperado, foram sequenciados para confirmação da presença dos genes.

Tabela 6 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção dos genes de virulência e grupos filogenéticos, temperaturas de hibridação (TH), tamanho da região amplificada por PCR, controles positivos (C+) e referência para condições de reacção

Oligo. iniciador	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	TH (°C)	Tam. (bp)	C+	Referência	
fimH F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	63	508	J96	Johnson & Stell, 2000	
fimH R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA					
fyuA F	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	63	880	Pyo29		
fyuA R	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA					
focG F	CAGCACAGGCAGTGGATACGA	63	360	ATCC 25922		
focG R	GAATGTCGCCTGCCATTGCT					
sfaS F	GTGGATACGACGATTACTGTG	63	244	UTI 134		
sfaS R	CCGCCAGCATTCCCTGTATTC					
usp F	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	66	1000	ATCC 25922		Siqueira <i>et al.</i> , 2009
usp R	CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAA					
fepA F	AAGCTGAATTCGTCGCCAG	55,8	560	ATCC 25922	Mellata, Ameiss, Mo, & Curtiss, 2010	
fepA R	CCGACCGATACTCCTGTTTC					
sitA F	ATCGGCATTACGTTGGTAGG	56,2	196	ATCC 25922		
sitA R	TCTCAATGGGGTTCCAGAAG					
iroN F	ATTGACGCCAGGCATTTTAC	56,2	202	ATCC 25922		
iroN R	GCTCCTGGTTGGGTTGAATA					
hlyA1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	61	1177	J96	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995	
hlyA2	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		498	J96		
cnf1-1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG					
cnf1-2	CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT		410	J96		
sfafoc1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC					
sfafoc2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		336	J96		
pap3	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT					
pap4	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		602	KS52		
iuc1	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT					
iuc2	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG		750	KS52		
afa1	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG					
afa2	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC					

Tabela 7 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na determinação do grupo filogenético, temperaturas de hibridação (TH), tamanho da região amplificada por PCR, controles positivos (C+) e referência para condições de reacção

Oligo. iniciador	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	TH (°C)	Tam. (bp)	C+	Referência
chuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	55	279	J96	Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000
chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				
yjaA.1	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG		211		
yjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC				
tspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA		152		
tspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG				
gadA F	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	65	373	ATCC 25922	Doumith, Day, Hope, Wain, & Woodford, 2012
gadA R	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC				
chuA F	ATGATCATCGCGGCGTGCTG		281		
chuA R	AAACGCGCTCGCGCCTAAT				
yjaA F	TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT		216		
yjaA R	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA				
TSPE4C2 F	GCGGGTGAGACAGAAACGCG		152		
TSPE4C2 R	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG				

#### Determinação do grupo filogenético

O grupo filogenético foi determinado através de um PCR-multiplex para os genes *chuA*, *yjaA* e para o fragmento de ADN TspE4-C2, tal como descrito por Clermont, Bonacorsi & Bingen (2000). Os resultados foram, posteriormente, confirmados, utilizando novas sequências de oligonucleotídeos iniciadores (Doumith *et al.*, 2012). Este método permite a discriminação de 4 grupos filogenéticos distintos: A, B1, B2 e D. As estirpes de referência *E. coli* J96 e *E. coli* ATCC 25922 foram usadas como controlo positivo nas reacções de PCR (Tabela 7).

#### Análise de grupos do genótipo de virulência

Para analisar os dados relativos à presença/ausência dos genes de virulência e marcadores das PAIs, foi construída uma tabela de dados booleanos em que o algarismo 1 indica a presença e o algarismo 0 indica a ausência do gene/marcador da PAI. A matriz de 22 características (genes de virulência e PAIs) e de 80 unidades taxonómicas operacionais (isolados de *E. coli*) em estudo foi depois usada para construir um dendrograma no *software* BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). As semelhanças entre diferentes

isolados foram calculadas através do coeficiente simple matching e do método de aglomeração Unweighted Pair-Group Method Average.

### **Análise estatística**

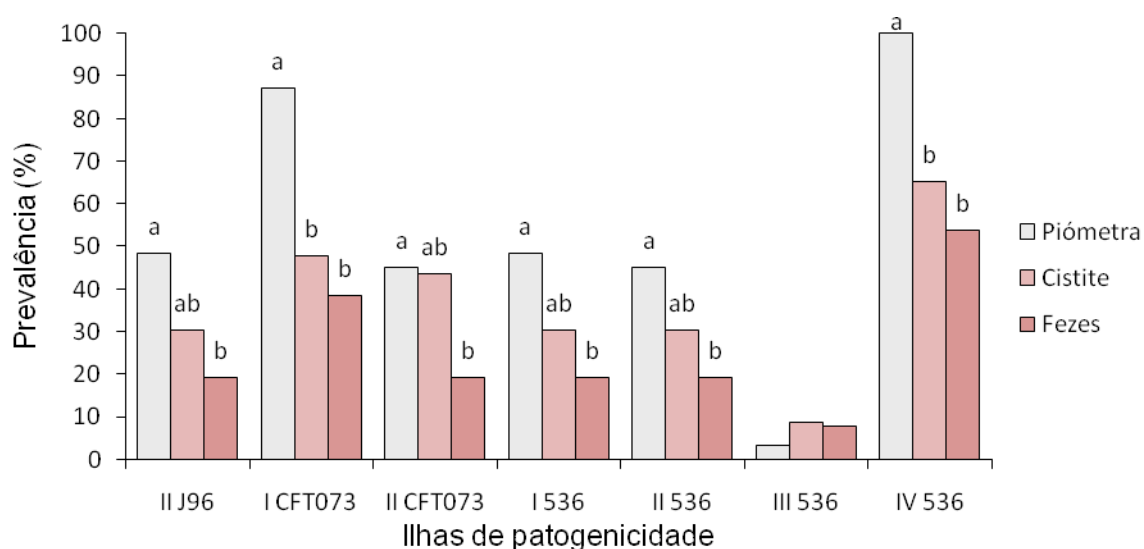
As prevalências dos genes de virulência e PAIs nos isolados das várias origens foram comparadas através do teste exacto de Fischer (Statistica 5.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA, 1995). O nível de significância escolhido foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Prevalência dos marcadores de ilhas de patogenicidade

A presença de pelo menos um marcador de PAI foi detectada em todos os isolados de piómetra (31/31), em 17 isolados de cistites (74%) e em 14 isolados fecais (54%). A ilha mais prevalente, em todos os isolados, foi a PAI IV<sub>536</sub>, sendo a PAI I<sub>CFT073</sub> a segunda mais prevalente. A PAI III<sub>536</sub> foi a ilha menos prevalente e a PAI I<sub>J96</sub> não foi identificada em nenhum dos isolados. Em comparação com os isolados fecais, os isolados de piómetra apresentaram uma maior prevalência ( $p < 0,05$ ) de todos os marcadores de PAIs, com excepção do marcador da PAI III<sub>536</sub> (Gráfico 1). Os isolados de piómetra apresentaram, em relação aos isolados de cistite, uma maior prevalência dos marcadores das PAIs IV<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub> ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Prevalência dos marcadores de ilhas de patogenicidade nos isolados de *E. coli* de piómetra, de cistite e de origem fecal

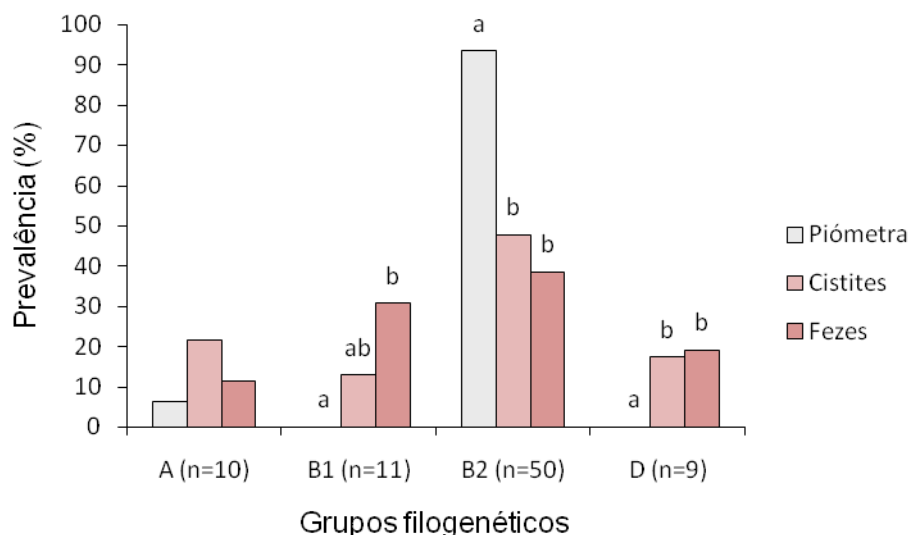


Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

### Associação entre ilhas de patogenicidade e grupos filogenéticos

Independentemente da origem dos isolados, o grupo filogenético mais prevalente foi o grupo B2. No entanto, este grupo foi mais prevalente ( $p < 0,01$ ) nos isolados de piómetra (93,5%) do que nos isolados de cistite (47,8%) e de origem fecal (38,5%) (Gráfico 2). O grupo filogenético D foi mais prevalente nos isolados de cistite ( $p < 0,05$ ) e de origem fecal ( $p < 0,01$ ) do que nos isolados de piómetra. O grupo filogenético B1 foi mais prevalente nos isolados de origem fecal do que nos isolados de piómetra ( $p < 0,01$ ) (Gráfico 2). O grupo filogenético A apresentou uma distribuição semelhante nos 3 grupos de isolados (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Prevalência dos grupos filogenéticos nos isolados das várias origens



Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Tabela 8 – Distribuição do número de ilhas de patogenicidade por grupos de isolados e grupos filogenéticos

Grupo filogenético	Número de ilhas por isolado								
	0	1	2	3	4	5	6	7	M
<b>Isolados de Piómetra</b>									
Grupo A (6,5%) <sup>b</sup>	-	2	-	-	-	-	-	-	1,0
Grupo B1 (0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo B2 (93,5%) <sup>a</sup>	-	-	8	6	1	8	5	1	4,0
Grupo D (0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total*	0	2	8	6	1	8	5	1	3,8
<b>Isolados de Cistite</b>									
Grupo A (21,7%) <sup>b</sup>	2	3	-	-	-	-	-	-	0,6
Grupo B1 (13%) <sup>b</sup>	3	-	-	-	-	-	-	-	0
Grupo B2 (47,8%) <sup>a</sup>	-	-	2	2	-	-	7	-	4,7
Grupo D (17,4%) <sup>b</sup>	1	2	1	-	-	-	-	-	1,0
Total**	6	5	3	2	0	0	7	0	2,6
<b>Isolados de Fezes</b>									
Grupo A (11,5%) <sup>b</sup>	2	1	-	-	-	-	-	-	0,3
Grupo B1 (30,8%) <sup>b</sup>	7	1	-	-	-	-	-	-	0,1
Grupo B2 (38,5%) <sup>a</sup>	-	-	2	3	-	2	2	1	4,2
Grupo D (19,2%) <sup>b</sup>	3	2	-	-	-	-	-	-	0,4
Total**	12	4	2	3	0	2	2	1	1,8

Legenda: M – Número médio de ilhas de patogenicidade por isolado. Linhas com letras diferentes ou números diferentes de asteriscos diferem significativamente no número médio de ilhas de patogenicidade por isolado ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Independentemente da sua origem, os isolados pertencentes ao grupo filogenético B2 apresentaram, em média, um maior número de marcadores de PAIs do que os isolados dos restantes grupos filogenéticos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8). O número médio de marcadores de PAIs por isolado foi maior nos isolados de piómetra (3,8) do que nos isolados de cistite (2,6) e nos isolados de origem fecal (1,8) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8). Este facto deverá estar relacionado com a maior prevalência do grupo filogenético B2 nos isolados de piómetra.

O grupo filogenético B2 foi o grupo que apresentou maior diversidade de PAIs, tendo sido identificadas todas as PAIs à excepção da I<sub>J96</sub> (Tabela 9). A PAI I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub> e II<sub>J96</sub> foram detectadas, exclusivamente, nos isolados do grupo B2 (Tabela 9). A PAI IV<sub>536</sub> foi detectada em todos os grupos filogenéticos e as PAIs I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub>, para além de se encontrarem no grupo B2, foram também detectadas nos grupos D ( $n=2$ ) e A ( $n=1$ ), respectivamente (Tabela 9). No entanto, a baixa frequência destas duas ilhas nos grupos filogenéticos D e A não terá qualquer significado biológico.

Tabela 9 – Distribuição dos marcadores de ilhas de patogenicidade em isolados de piómetra, cistite e fecais, de acordo com o grupo filogenético

Grupo filogenético	Nº de isolados (%)	Nb (%)	Ilhas de patogenicidade							
			I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	III <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>	I <sub>J96</sub>	II <sub>J96</sub>
<b>A</b>										
Piómetra	2 (6,5)	2 (6,5)	0	0	0	2	0	0	0	0
Cistite	5 (21,7)	3 (13)	0	0	0	2	0	1	0	0
Fezes	3 (11,5)	1 (3,8)	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	10	6	0	0	0	5	0	1	0	0
<b>B1</b>										
Piómetra	0 (0) <sup>c</sup>	0 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistite	3 (13) <sup>cd</sup>	0 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0
Fezes	8 (30,8) <sup>d</sup>	1 (3,8)	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	11	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>B2</b>										
Piómetra	29 (93,5) <sup>a</sup>	29 (93,5)	15	14	1	29	27	14	0	15
Cistite	11 (47,8) <sup>b</sup>	11 (47,8)	7	7	2	11	9	9	0	7
Fezes	10 (38,5) <sup>b</sup>	10 (38,5)	5	5	2	10	10	5	0	5
Total	50	50	27	26	5	50	46	28	0	27
<b>D</b>										
Piómetra	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistite	4 (17,4) <sup>b</sup>	3 (13)	0	0	0	2	2	0	0	0
Fezes	5 (19,2) <sup>b</sup>	2 (7,7)	0	0	0	2	0	0	0	0
Total	9	5	0	0	0	4	2	0	0	0

Legenda: Nb – número de isolados com PAIs. Colunas com letras diferentes diferem significativamente: <sup>a,b</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>c,d</sup> –  $p < 0,01$  (teste exacto de Fischer)

## Combinação de ilhas de patogenicidade nos isolados de *E. coli* de piómetra, cistite e origem fecal

As combinações de PAIs observadas nos isolados de *E. coli* de piómetra, cistite e de origem fecal estão descritas na Tabela 10, Tabela 11 e Tabela 12, respectivamente. Em todos os grupos de isolados, as combinações mais prevalentes incluíram as PAIs IV<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub>. Nos isolados de piómetra, a combinação de apenas essas duas ilhas foi a mais prevalente (25,8%), seguida das combinações das 3 ilhas, PAI IV<sub>536</sub>, I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub> (19,4%), e de 5 ilhas, PAI I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, IV<sub>536</sub>, II<sub>J96</sub> e II<sub>CFT073</sub> (19,4%) e, posteriormente, da combinação das PAIs I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, IV<sub>536</sub>, II<sub>J96</sub>, I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub> (16,1%). Esta última é também a combinação mais frequente nos isolados de cistite (21,7%). Já nos isolados fecais, a combinação mais prevalente incluiu as ilhas IV<sub>536</sub>, I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub>, não havendo, no entanto, uma grande diferença entre as prevalências das várias combinações, neste grupo de isolados. Dos isolados de piómetra, apenas 6,5% tinham menos de 2 PAIs. No entanto, para os isolados de cistite e fecais este valor foi de 47,8% e 61,5%, respectivamente.

Tabela 10 – Combinação de marcadores de PAIs nos isolados de piómetra

Nº de ilhas											
2 ilhas	25,8%	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>								
3 ilhas	19,4%	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>							
4 ilhas	3,2%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>						
5 ilhas	19,4%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>					
	3,2%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	II <sub>CFT073</sub>					
	3,2%	I <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>					
6 ilhas	16,1%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>				
7 ilhas	3,2%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	III <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>			

Tabela 11 – Combinação de marcadores de PAIs nos isolados de cistite

Nº de ilhas											
2 ilhas	13%	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>								
3 ilhas	8,7%	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>							
6 ilhas	8,7%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	III <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	II <sub>CFT073</sub>				
	21,7%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>				

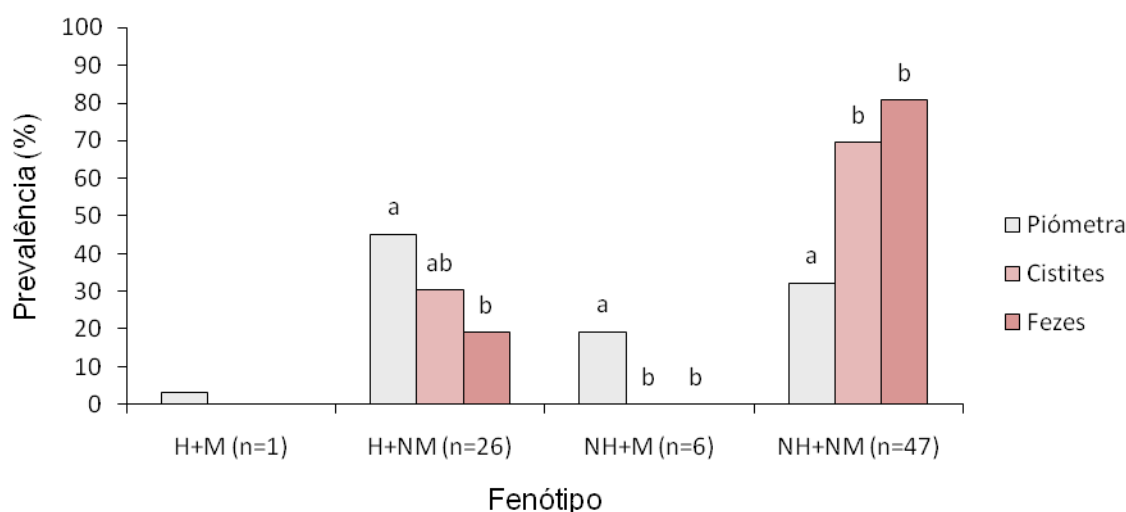
Tabela 12 – Combinação de marcadores de PAIs em isolados fecais

Nº de ilhas								
2 ilhas	7,7%	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>					
3 ilhas	11,5%	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>				
5 ilhas	7,7%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>		
6 ilhas	3,8%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>	
	3,8%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	III <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>J96</sub>	I <sub>CFT073</sub>	
7 ilhas	3,8%	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	III <sub>536</sub>	IV <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CFT073</sub>

### Associação entre ilhas de patogenicidade e os fenótipos dos isolados

O fenótipo hemolítico foi mais frequente nos isolados de piómetra e o fenótipo não hemolítico e não mucoso foi encontrado maioritariamente nos isolados de cistite e de origem fecal (Gráfico 3). O fenótipo mucóide apenas foi verificado em isolados de piómetra (Gráfico 3).

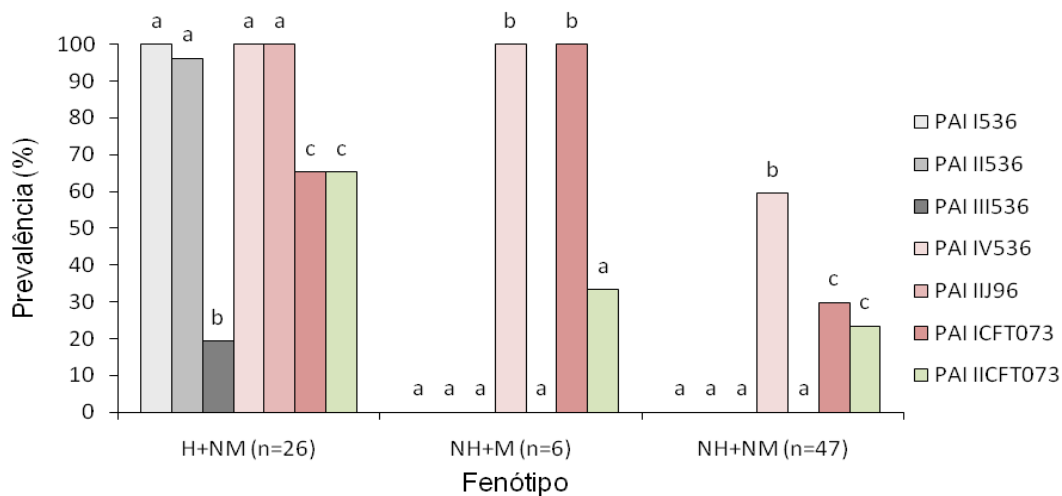
Gráfico 3 – Prevalência dos diferentes fenótipos nos isolados de *E. coli* de piómetra, cistite e de origem fecal



Legenda: H+M – Hemolítico e mucóide; H+NM – Hemolítico e não mucóide; NH+M – Não hemolítico e mucóide; NH+NM – Não hemolítico e não mucóide. Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

As PAIs I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub> e II<sub>J96</sub> apenas foram detectadas em estirpes hemolíticas e não mucóides (Gráfico 4). A PAI IV<sub>536</sub> foi detectada em todas as estirpes com fenótipo hemolítico e não mucóide e com fenótipo não hemolítico e mucóide e apenas em 59,6% das estirpes com fenótipo não hemolítico e não mucóide (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Associação entre ilhas de patogenicidade e os fenótipos dos isolados das colónias de *E. coli*

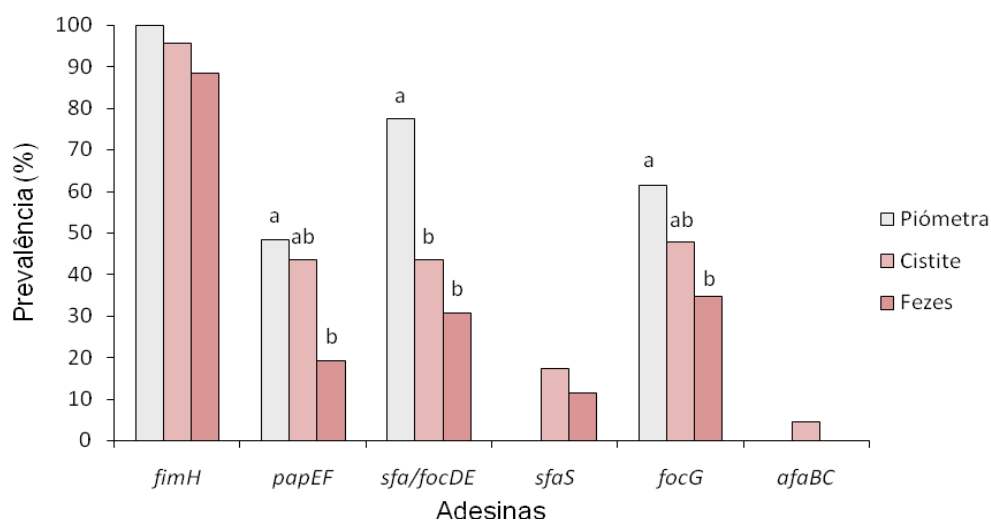


Legenda: H+M – Hemolítico e mucóide; H+NM – Hemolítico e não mucóide; NH+M – Não hemolítico e mucóide; NH+NM – Não hemolítico e não mucóide. Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

### Prevalência dos genes que codificam para factores de virulência

Dos genes que codificam para as adesinas, o *fimH*, foi o gene mais prevalente nos três grupos em estudo (Gráfico 5). O gene *sfa/focDE* foi mais prevalente nos isolados de piómetra (77,4%) do que nos isolados de cistite (43,5%;  $p < 0,05$ ) e de origem fecal (30,8%;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 5). Os genes *focG* e *papEF* foram mais prevalentes ( $p < 0,05$ ) nos isolados de piómetra (61,3% e 48,4%, respectivamente) do que nos isolados de origem fecal (34,6% e 19,2%, respectivamente) (Gráfico 5). O gene *sfaS* não foi detectado nos isolados de piómetra e o gene *afaBC* foi detectado somente num isolado de cistite (4,3%) (Gráfico 5).

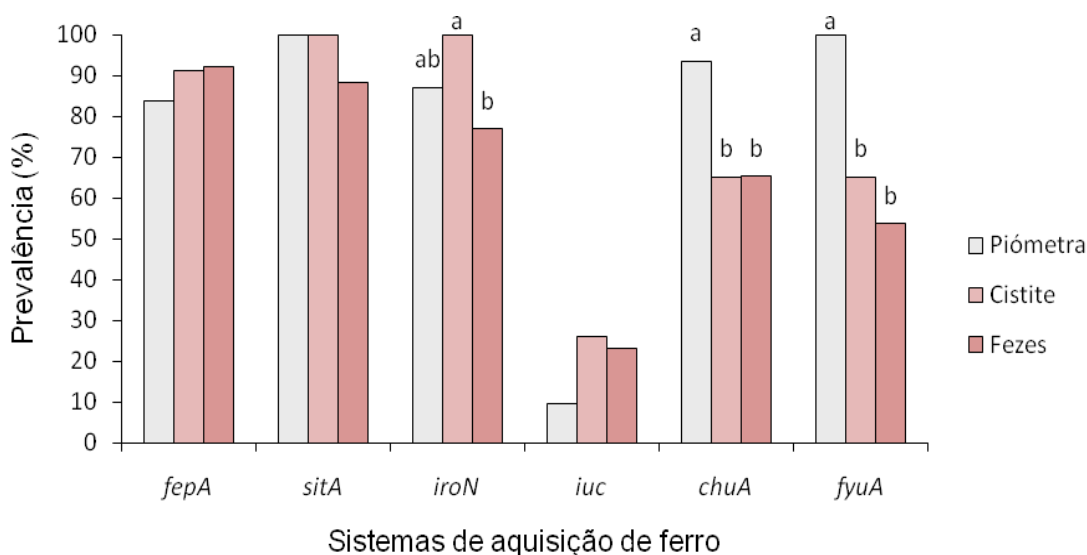
Gráfico 5 – Prevalência dos genes que codificam adesinas nos isolados das várias origens



Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

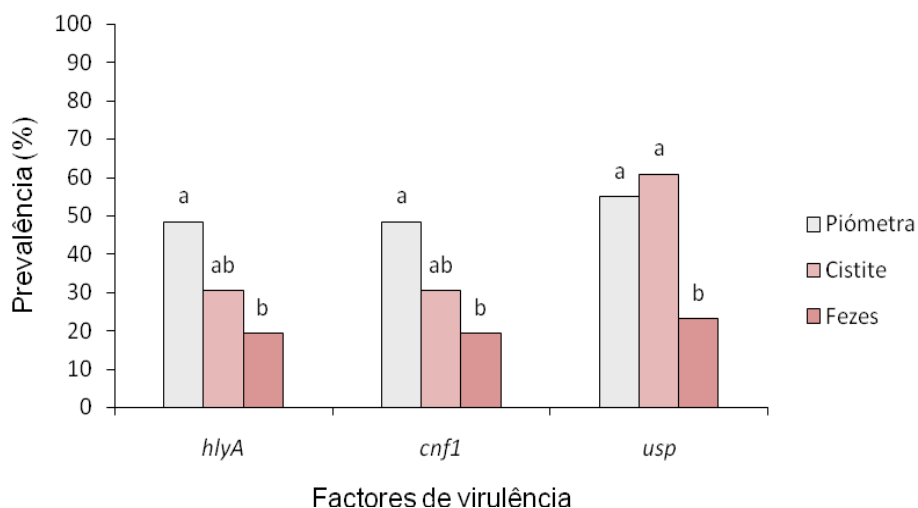
Em relação aos genes que codificam para os sistemas de captação de ferro, verificou-se uma elevada prevalência dos genes estudados, com excepção do gene *iucD* (9,7% a 26,1%) nos 3 grupos de isolados (Gráfico 6). Contudo, o gene *chuA*, que codifica para o receptor do grupo heme, e o gene *fyuA* que codifica para o sideróforo yersiniabactina, foram mais prevalentes nos isolados de piómetra ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 6). O gene *iroN*, que codifica para a salmoquelina foi mais prevalente nos isolados de cistite do que nos isolados de origem fecal ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 6). O número médio de genes que codificam para os sistemas de captação de ferro foi semelhante nos isolados de piómetra, de cistite e de origem fecal (4,7, 4,5 e 3,9 genes por isolado, respectivamente) (Tabela 13). A prevalência dos genes *hlyA* e *cnf1* foi maior nos isolados de piómetra do que nos isolados de origem fecal ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7). O gene *usp* foi mais prevalente nos isolados de cistite e de piómetra do que nos isolados fecais ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7).

Gráfico 6 – Prevalência dos genes que codificam sistemas de captação de ferro nos isolados das várias origens



Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Gráfico 7 – Prevalência de genes que codificam toxinas e proteína específica uropatogénica nos isolados de piómetra, cistite e de origem fecal



Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Tabela 13 – Distribuição dos genes que codificam para as diferentes classes de factores de virulência em relação à origem dos isolados

	Número de genes de factores de virulência por isolado							M
	0	1	2	3	4	5	6	
<b>Isolados de piómetra</b>								
Adesinas	-	4	5	13	9	-	-	2,9
Sistemas captação ferro	-	-	-	2	5	23	1	4,7
Outros FVs	9	7	1	14	-	-	-	1,6
<b>Isolados de cistite</b>								
Adesinas	1	6	5	3	7	1	-	2,5
Sistemas captação ferro	-	-	-	4	6	11	2	4,5
Outros FVs	9	7	-	7	-	-	-	1,2
<b>Isolados fecais</b>								
Adesinas	3	13	2	3	3	2	-	1,8
Sistemas captação ferro	-	2	2	6	6	6	4	3,9
Outros FVs	17	4	3	2	-	-	-	0,6

Legenda: M – Número médio de genes que codificam para factores de virulência por isolado

### Associação entre factores de virulência

Em todos os isolados de piómetra e cistite, foi identificado mais do que um gene de sistemas de captação de ferro (Tabela 14 e Tabela 15). A combinação dos genes *fepA*, *sitA*, *iroN*, *chuA* e *fyuA* foi a mais frequente tanto nos isolados de piómetra como nos de cistite (Tabela 14 e Tabela 15). Os isolados fecais, na sua maioria, também possuem mais do que um gene

que codifica para sistemas de captação de ferro, sendo que nestes, tanto a combinação de genes já referida, como a combinação dos genes *fepA*, *sitA* e *iroN* tem a prevalência mais elevada (19,2%), seguindo-se, em prevalência, a combinação dos 6 genes pesquisados (15,4%) (Tabela 16).

Tabela 14 – Combinação de genes que codificam para sistemas de captação de ferro em isolados de piómetra

Nº de genes						
3 genes	6,5%	<i>sitA</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>		
4 genes	6,5%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>	
	9,7%	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>	
5 genes	67,7%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>
	3,2%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>
6 genes	6,5%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>iucD</i>	<i>chuA</i> <i>fyuA</i>

Tabela 15 – Combinação de genes que codificam para sistemas de captação de ferro em isolados de cistite

Nº de genes						
3 genes	17,4%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>		
4 genes	8,7%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	
	8,7%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>lucD</i>	
	8,7%	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>	
5 genes	8,7%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>
	39,1%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>
6 genes	8,7%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>iucD</i>	<i>chuA</i> <i>fyuA</i>

Tabela 16 – Combinação de genes que codificam para sistemas de captação de ferro em isolados fecais

Nº de genes						
2 genes	3,8%	<i>fepA</i>	<i>chuA</i>			
	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>			
3 genes	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>chuA</i>		
	19,2%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>		
4 genes	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>fyuA</i>	
	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	
	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>chuA</i>	<i>iucD</i>	
	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>	
	7,7%	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>	
5 genes	3,8%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>lucD</i>	<i>fyuA</i>
	19,2%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>
6 genes	15,4%	<i>fepA</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>iucD</i>	<i>chuA</i> <i>fyuA</i>

Relativamente à presença de genes que codificam para adesinas, em todos os grupos de isolados, identificaram-se, maioritariamente, combinações de 2 (*fimH* e *focG*) ou 3 (*fimH*, *focG* e *papEF*) genes (Tabela 17, Tabela 18 e Tabela 19). No grupo dos isolados de piómetra apenas 6 isolados tinham apenas um gene que codifica para uma adesina. Nos outros dois grupos, a percentagem de isolados com apenas um gene que codifica para 1 adesina foi maior do que nos isolados de piómetra: 30,4% nos isolados de cistite e 61,5% nos isolados fecais (Tabela 18 e Tabela 19).

Tabela 17 – Combinação de genes que codificam para adesinas em isolados de piómetra

Nº de genes				
2 genes	19,4%	<i>fimH</i>	<i>papEF</i>	
	32,3%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	
3 genes	29%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	<i>papEF</i>

Tabela 18 – Combinação de genes que codificam para adesinas em isolados de cistite

Nº de genes					
2 genes	17,4%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>		
	13%	<i>fimH</i>	<i>papEF</i>		
	4,3%	<i>fimH</i>	<i>afaBC</i>		
3 genes	17,4%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	<i>papEF</i>	
	4,3%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	<i>sfaS</i>	
	4,3%	<i>fimH</i>	<i>papEF</i>	<i>sfaS</i>	
4 genes	8,7%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	<i>papEF</i>	<i>sfaS</i>

Tabela 19 – Combinação de genes que codificam para adesinas em isolados fecais

Nº de genes					
2 genes	15,4%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>		
	3,8%	<i>fimH</i>	<i>sfaS</i>		
3 genes	11,5%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	<i>papEF</i>	
4 genes	7,7%	<i>fimH</i>	<i>focG</i>	<i>papEF</i>	<i>sfaS</i>

A associação entre o gene *usp*, *hlyA* e *cnf1* ocorre, na maioria dos casos, nos isolados de piómetra e cistite (Tabela 20 e Tabela 21). Nos isolados fecais, não existem grandes diferenças de prevalência entre a combinação dos 3 genes e a combinação apenas dos genes *hlyA* e *cnf1* (Tabela 22). Em todos os grupos de isolados, os genes *hlyA* e *cnf1* encontram-se sempre em associação (Tabela 20, Tabela 21 e Tabela 22).

Tabela 20 – Combinação de genes que codificam para hemolisina, CNF-1 e Usp em isolados de piómetra

Nº de genes				
2 genes	16,1%	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	
3 genes	32,3%	<i>usp</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>

Tabela 21 – Combinação de genes que codificam para hemolisina, CNF-1 e Usp em isolados de cistite

Nº de genes				
3 genes	30,4%	<i>usp</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>

Tabela 22 – Combinação de genes que codificam para hemolisina, CNF-1 e Usp em isolados fecais

Nº de genes				
2 genes	11,5%	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	
3 genes	7,7%	<i>usp</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>

### Associação entre factores de virulência e grupos filogenéticos

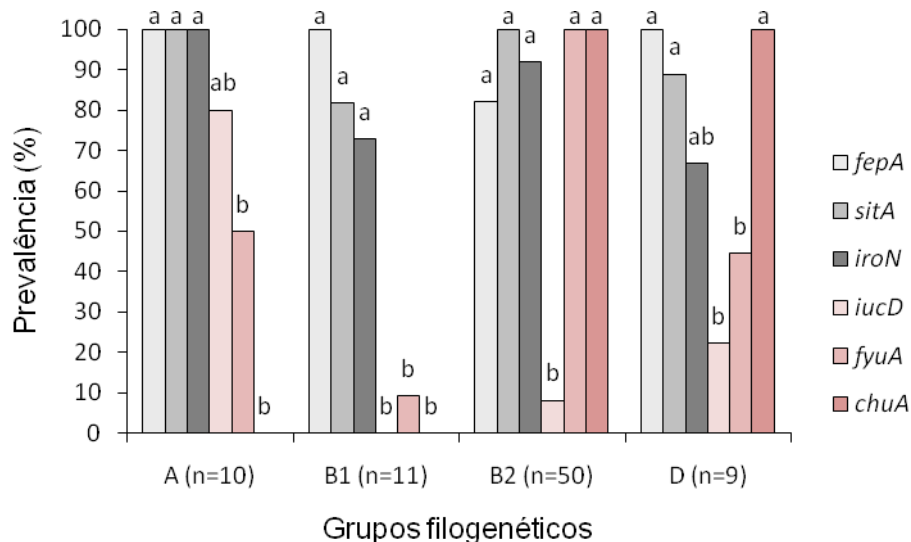
O padrão de distribuição dos genes que codificam para FVs foi semelhante ao padrão de distribuição dos marcadores de PAIs, observando-se que o número médio de genes identificados foi mais elevado nos isolados do grupo filogenético B2 e, conseqüentemente, nos isolados de piómetra (Tabela 23). Em relação aos sistemas de captação de ferro, o gene *iucD* foi mais prevalente no grupo filogenético A ( $p < 0,05$ ) do que nos outros 3 grupos. O gene *fyuA* foi mais prevalente nos isolados do grupo B2 ( $p < 0,001$ ) e o gene *chuA*, como seria de esperar, nos isolados dos grupos D e B2 ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 8).

Tabela 23 – Número de genes que codificam para factores de virulência em relação à origem dos isolados e ao grupo filogenético

Grupo filogenético	Número de genes que codificam para factores de virulência por isolado													M
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
<b>Isolados de Piómetra</b>														
A (6,5%)	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	7,0
B1 (0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2 (93,5%)	-	-	2	1	-	2	7	2	1	10	4	-	-	9,3
D (0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	0	0	2	1	0	4	7	2	1	10	4	0	-	9,1
<b>Isolados de Cistite</b>														
A (21,7%)	-	-	-	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	5,6
B1 (13%)	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3
B2 (47,8%)	-	-	-	-	-	-	-	3	1	1	5	1	-	11
D (17,4%)	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	6,5
Total	0	0	2	5	2	2	1	4	1	2	3	1	-	8,0
<b>Isolados de Fezes</b>														
A (11,5%)	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0
B1 (30,8%)	2	1	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0
B2 (38,5%)	-	-	-	-	-	-	4	1	-	3	1	1	-	9,9
D (19,2%)	1	1	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4,4
Total	3	2	2	6	2	2	3	1	1	2	2	0	-	6,3

Legenda: M – Número médio de genes que codificam para factores de virulência por isolado

Gráfico 8 – Associação de sistemas de captação de ferro e grupos filogenéticos

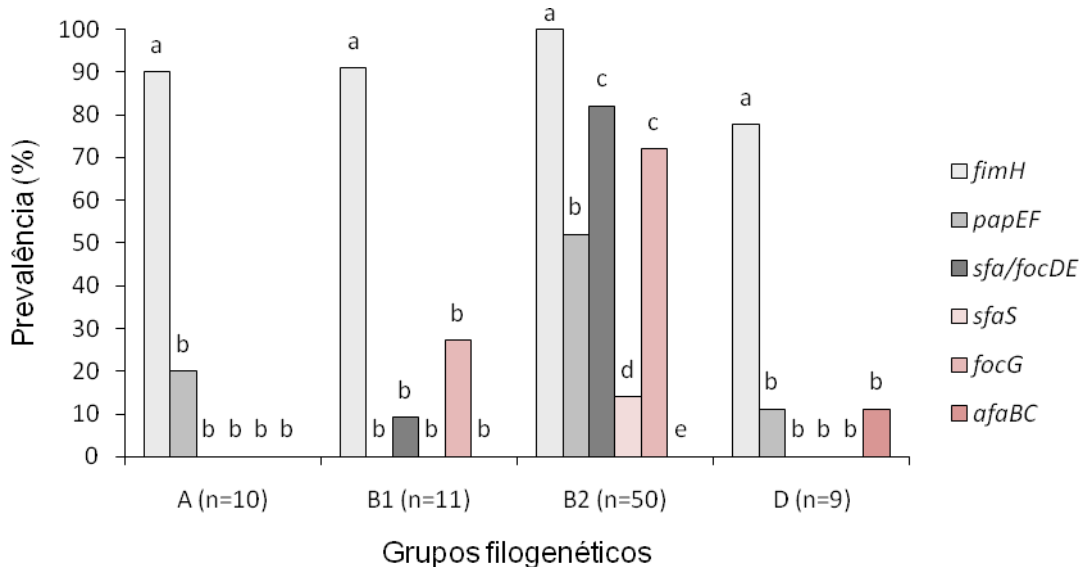


Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

A prevalência dos genes que codificam para adesinas foi maior nos isolados do grupo B2 do que nos restantes grupos filgenéticos ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 9). No entanto, o gene *fimH* foi igualmente prevalente (>75%) nos quatro grupos filogenéticos, o gene *sfaS* apenas foi detectado em 7 isolados do grupo B2 e o gene *afaBC* somente em 1 isolado do grupo filogenético D (Gráfico 9).

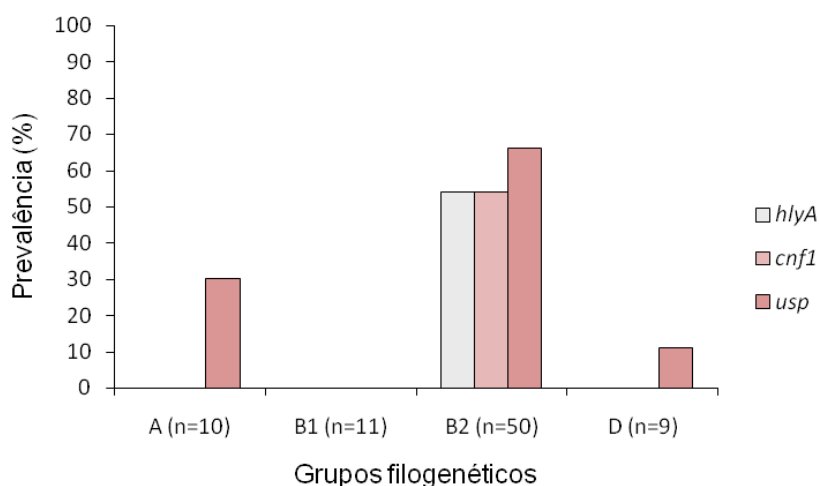
Os genes *hlyA* e *cnf1* foram detectados exclusivamente nos isolados do grupo filogenético B2 (Gráfico 10). O gene *usp* foi detectado apenas nos grupos A, B2 e D, sendo mais frequente no grupo B2 ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 10).

Gráfico 9 – Associação entre genes que codificam para adesinas e grupos filogenéticos



Legenda: Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Gráfico 10 – Associação entre genes que codificam para toxinas e proteína específica uropatogénica e grupos filogenéticos

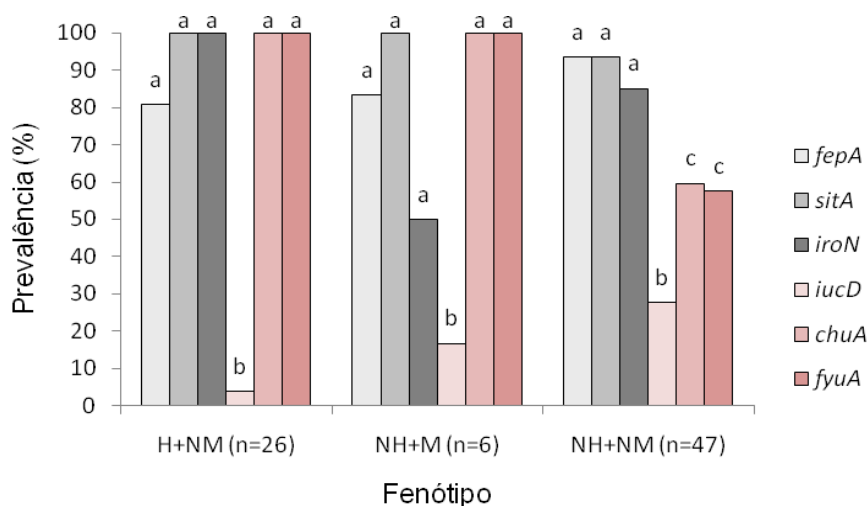


### Associação entre genes que codificam para factores de virulência e os fenótipos dos isolados

Em relação aos genes que codificam para sistemas de captação de ferro, os isolados com fenótipo hemolítico apresentam maior prevalência dos genes *iroN*, *chuA* e *fyuA* do que os isolados com fenótipo não hemolítico e não mucóide ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 11).

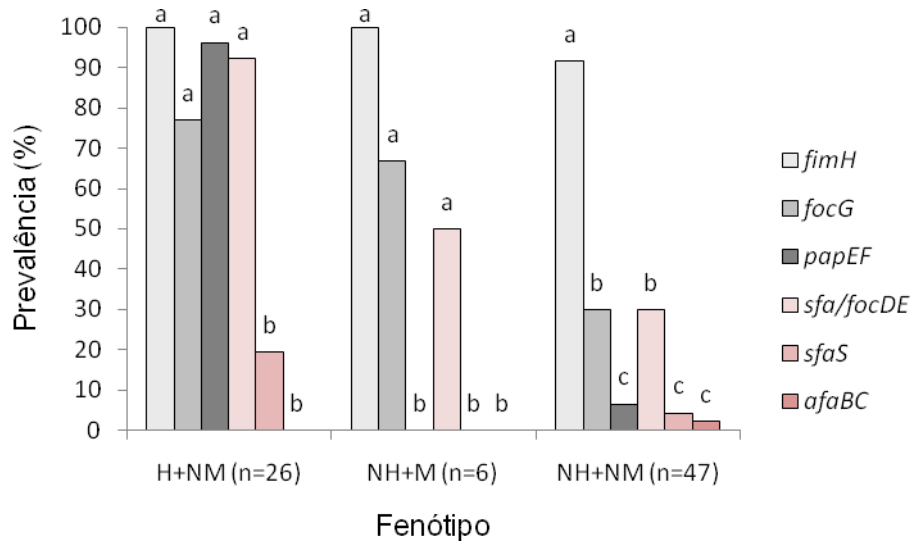
Relativamente às adesinas, verificou-se que os isolados com fenótipo hemolítico e não mucóide apresentaram uma maior prevalência do gene *papEF* ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 12). Os genes *hlyA* e *cnf1* foram detectados em todos os isolados hemolíticos e não mucóides, não tendo sido identificados em isolados com fenótipo não hemolítico ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 13).

Gráfico 11 – Associação entre genes que codificam para sistemas de captação de ferro e fenótipos dos isolados



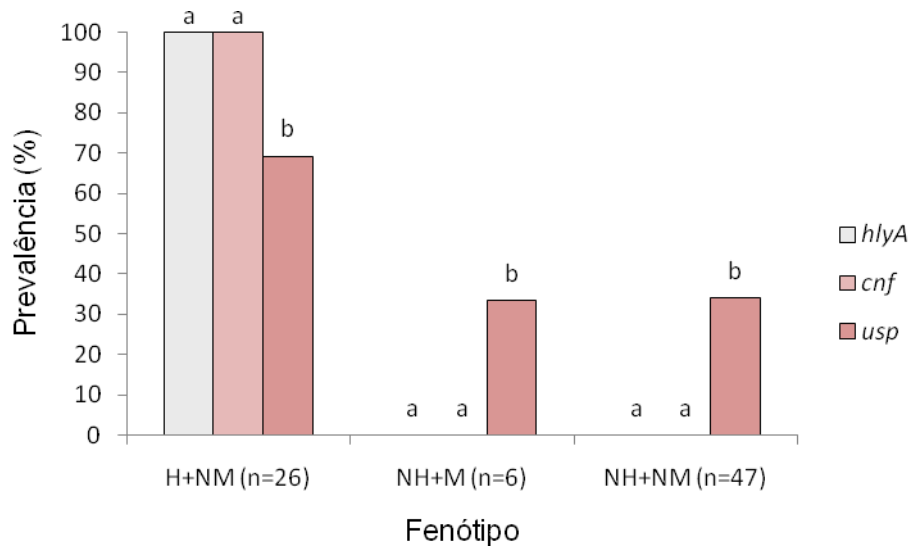
Legenda: H+NM – Hemolítico e não mucóide; NH+M – Não hemolítico e mucóide; NH+NM – Não hemolítico e não mucóide. Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Gráfico 12 – Associação entre genes que codificam para adesinas e fenótipos dos isolados



Legenda: H+NM – Hemolítico e não mucóide; NH+M – Não hemolítico e mucóide; NH+NM – Não hemolítico e não mucóide. Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

Gráfico 13 – Associação entre genes que codificam para a hemolisina, CNF-1 e Usp e fenótipo dos isolados



Legenda: H+NM – Hemolítico e não mucóide; NH+M – Não hemolítico e mucóide; NH+NM – Não hemolítico e não mucóide. Colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , teste exacto de Fischer)

### **Avaliação dos perfis de virulência**

A associação dos isolados segundo os seus perfis de virulência pode ser observada no dendrograma da Figura 1. Com base numa semelhança maior ou igual a 77%, foi possível identificar três grupos (A, B e C). O grupo A é maioritariamente constituído por isolados de cistite (n=11) e de origem fecal (n=15) pertencentes aos grupos filogenéticos A, B1 e D. Fazem ainda parte deste grupo os 2 isolados de piómetra do grupo filogenético A. Os isolados pertencentes a este grupo apresentam, em média, 4,8 genes que codificam para FVs e 0,4 marcadores de PAIs. O grupo A pôde ser dividido em dois sub-grupos de isolados, com base na presença do gene *fyuA* e do marcador da PAI IV<sub>536</sub>.

O grupo B é constituído, principalmente, por isolados de piómetra (n=14), mas contém também isolados de cistite (n=5) e de origem fecal (n=6), pertencentes ao grupo filogenético B2 (com excepção de 2 isolados do grupo D). Os isolados deste grupo apresentam, em média, 7,8 genes que codificam para FVs e 2,4 marcadores de PAIs. Além dos FVs e PAIs observados no grupo A, os isolados do grupo B apresentaram uma maior prevalência dos genes *sfa/focDE*, *focG* e *usp* e dos marcadores para as PAI I<sub>CFT073</sub> e IV<sub>536</sub>.

O grupo C é constituído, essencialmente, por isolados de piómetra (n=15), incluindo também isolados de cistite (n=7) e de origem fecal (n=5). Todos os isolados pertencem ao grupo filogenético B2 e apresentam um elevado número de genes que codificam para FVs (média de 11,4) e marcadores de PAIs (média de 5,6). Os isolados do grupo C são potencialmente mais virulentos e distinguem-se dos isolados dos grupos anteriores pela presença dos genes *hlyA* e *cnf1* e dos marcadores das PAIs I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub> e II<sub>J96</sub>. Por outro lado, os genes *papEF* e *sfa/focDE* estão presentes com elevada prevalência (96,3% e 92,6%, respectivamente). Foi ainda possível verificar que todos os isolados positivos para o gene *fyuA* foram positivos para o marcador da PAI IV<sub>536</sub> e que os isolados positivos para os genes *hlyA* e *cnf1* foram também positivos para o marcador da PAI II<sub>J96</sub> e, em 96,3% dos casos, positivos para o gene *papEF*. Não foi observada associação entre a presença do gene *hlyA* e o marcador da PAI I<sub>CFT073</sub>.

Figura 1 – Dendrograma obtido através do perfil de virulência dos isolados analisados



## DISCUSSÃO

Pretendeu-se, com este trabalho, comparar os perfis de virulência entre os isolados de piómetra, cistite e de origem fecal. Deste modo, foi avaliada a presença de marcadores de PAIs e de genes que codificam para determinados FVs associados com a adesão e sobrevivência da bactéria, bem como a capacidade de destruição celular.

Embora os isolados de piómetra, cistite e de origem fecal tenham apresentado uma sobreposição do perfil de virulência, a prevalência de marcadores de PAIs foi significativamente maior nos isolados de piómetra (100%) comparativamente aos isolados de cistite (74%) e de origem fecal (54%). Isto sugere que os isolados de piómetra estarão mais bem adaptados a diversos ambientes e tecidos alvo (Lloyd, Henderson, Vigil, & Mobley, 2009). Por outro lado, não houve diferença significativa entre a prevalência de marcadores de PAIs, nos isolados de origem fecal e de cistite. Num estudo realizado por Sabaté *et al.* (2006), o número de isolados de origem fecal com marcadores de PAIs (40%) foi também elevado. No entanto, nesse estudo, 93% dos isolados de ITU possuíam marcadores de PAIs, havendo uma diferença significativa entre os dois grupos de isolados. No nosso estudo, dentro do grupo das cistites, em 61,5% das estirpes não foi detectado ou foi detectado apenas um marcador das PAIs analisadas, o que sugere que esta afecção, na cadela, pode ser provocada por estirpes com um menor potencial de virulência. Por outro lado, as estirpes de piómetra têm um elevado potencial de virulência, possuindo um grande número de marcadores de PAIs e genes de virulência. Neste grupo, em 90% dos isolados, foi detectado mais do que um marcador de PAIs. No entanto, existem isolados de cistite e de origem fecal com estas características, o que sugere que poderão induzir piómetra, em cadelas susceptíveis.

As PAIs IV<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub> foram as mais prevalentes nos três grupos de isolados. Tal como anteriormente descrito, a elevada prevalência destas ilhas deverá estar associada à sua estabilidade no genoma bacteriano (Middendorf *et al.*, 2004; Sabaté *et al.*, 2006). Já a PAI III<sub>536</sub>, que codifica para as fímbrias S e a salmoquelina, entre outros FVs, foi a menos prevalente de todas as PAIs detectadas. Sabaté *et al.* (2006) identificou esta PAI em apenas 2% de isolados uropatogénicos humanos e Li *et al.* (2010) não a detectou em isolados de origem fecal de humanos. Estes resultados poderão estar relacionados com a grande instabilidade desta PAI, tal como demonstrado por Middendorf *et al.* (2004).

A PAI IV<sub>536</sub> codifica para o sideróforo yersiniabactina e a PAI I<sub>CFT073</sub> codifica para a  $\alpha$ -hemolisina, as fímbrias P e a aerobactina, entre outros factores. A elevada prevalência da PAI IV<sub>536</sub> em diferentes enterobactérias, tanto patogénicas como comensais (Schubert, Rakin, & Heesemann, 2004), levanta dúvidas acerca da importância do seu papel na patogenicidade da *E. coli* (Karch *et al.*, 1999; Hacker & Carniel, 2000). O seu papel na virulência de *E. coli* parece estar dependente do tipo de infecção. No modelo de ITU em

ratinho, a co-infecção com uma estirpe em que a PAI IV<sub>536</sub> foi inactivada e a estirpe selvagem, mostrou que o mutante teve menor crescimento, sugerindo que esta PAI poderá ter um papel relevante na patogenia da pielonefrite (Lloyd *et al.*, 2009). Já num estudo semelhante, num modelo de septicemia, Tourret, Diard, Garry, Matic e Denamur (2010) verificaram que a estirpe com a PAI inactivada tem crescimento semelhante à estirpe selvagem, o que sugere que, em casos de septicemia, a PAI IV<sub>536</sub> pode não contribuir para o aumento da patogenicidade da bactéria.

Apenas a PAI IV<sub>536</sub> e a PAI I<sub>CFT073</sub> foram significativamente mais prevalentes nos isolados de piómetra do que nos restantes. Este facto sugere que estas ilhas poderão ter um papel relevante na patogénese da piómetra e não uma função meramente de *fitness*.

Neste estudo, a PAI I<sub>CFT073</sub>, nem sempre esteve associada à presença dos genes *hlyA*, *papEF* e *iucD* e ao fenótipo hemolítico. Uma vez que as PAIs são material genético instável, altamente susceptível a processos de incorporação e deleção de genes (Hacker *et al.*, 1997; Middendorf *et al.*, 2004), pelo menos, parte da PAI I<sub>CFT073</sub> deverá ter sofrido deleção nos isolados de *E. coli* em estudo.

O mesmo FV pode, no entanto, ser codificado por mais do que uma PAI. Neste estudo, verificou-se que os isolados de *E. coli* podem ter, no seu genoma, até três PAIs que, potencialmente, podem codificar para a  $\alpha$ -hemolisina (I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub> e I<sub>J96</sub>) e para as fímbrias P (I<sub>J96</sub>, I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub>). Nos casos em que a mesma estirpe possui várias PAIs que codificam para o mesmo factor de virulência, a deleção total ou parcial de uma das ilhas não altera o fenótipo da bactéria. Estas deleções dão lugar à incorporação de novo material genético com possíveis novas, e mais vantajosas, funções na colonização de novos ambientes. Para além disso, confere à bactéria uma maior habilidade para evadir-se do sistema imunitário e assim persistir no hospedeiro num estadio crónico de infecção (Blum *et al.*, 1994; Middendorf *et al.*, 2001). Por outro lado, PAIs que conferem alguma vantagem à bactéria têm tendência a tornar-se mais estáveis no seu genoma, através da deleção de genes que lhes conferem mobilidade (Karch *et al.*, 1999; Middendorf *et al.*, 2004).

A ilha II<sub>J96</sub>, que codifica para a  $\alpha$ -hemolisina, as fímbrias Prs e o CNF-1 esteve associada à presença dos genes *hlyA* e *cnf1*, em 100% dos casos, à presença dos genes *papEF*, em cerca de 95% dos casos, e a 100% das colónias hemolíticas. Isto sugere que estes genes deverão estar associados nesta ilha e que o codão *hly* é funcional.

Os isolados de piómetra tiveram uma maior prevalência de colónias com fenótipo hemolítico e foram os únicos em que se verificou o fenótipo mucóide. As prevalências dos genes *hlyA* e *cnf1* foram significativamente mais elevadas em isolados de piómetra (48,4%) do que em isolados de origem fecal (19,2%), o que está de acordo com resultados de outros trabalhos (Chen *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2009). Em isolados de piómetra, Siqueira *et al.* (2009) reporta uma prevalência de 34,6% do gene *hlyA* e 40,4% do gene *cnf1* e Chen *et al.* (2003)

obteve uma prevalência de 52% para ambos os genes. A hemolisina é uma toxina que provoca a lise celular de eritrócitos e células nucleadas do hospedeiro, induzindo inflamação, o que favorece a translocação da bactéria (Bien, Sokolova, & Bozko, 2012). O CNF-1 parece facilitar a bacteriemia, devido a interferir no processo de fagocitose pelos polimorfonucleares neutrófilos (Fiorentini *et al.*, 1997; Doye *et al.*, 2002). O fenótipo mucóide poderá também contribuir para a virulência de *E. coli*, uma vez que os mucopolissacarídeos ajudam a bactéria a evadir-se do sistema imunitário do hospedeiro e a formar biofilmes (Beloin, Roux, & Ghigo, 2008; Todar, 2008; Bien *et al.*, 2012).

A ligação das bactérias às células hospedeiras é um passo crucial da infecção. No nosso estudo, os isolados de piômetra e cistite apresentaram um número médio de genes que codificam para adesinas maior do que os isolados de origem fecal. A elevada prevalência de genes para adesinas em isolados de piômetra e cistite sugere um mecanismo de redundância funcional. Num estudo em que se realizou a inativação simples, dupla ou tripla dos operões *fim*, *sfa* e *pap*, apenas se verificaram diferenças significativas na adesão a explantes de endométrio canino, nas estirpes que não possuíam nenhuma das 3 adesinas (Krekeler *et al.*, 2013). Este resultado sugere que a ausência de uma dessas fímbrias é colmatada pela presença de outras e, por isso, não há uma contribuição específica de nenhuma delas para a adesão ao endométrio canino.

O gene que codifica para as fímbrias tipo 1 foi o mais prevalente em todos os grupos de isolados. O mesmo foi verificado por Qin *et al.* (2013), num estudo realizado em isolados UPEC e de origem fecal de humanos. As fímbrias P, codificadas pelo operão *pap*, estão frequentemente associadas a isolados de piômetra (36,5 a 52%) (Chen *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2009; Ghanbarpour & Akhtardanesh, 2012). Também neste estudo a prevalência do gene *papEF* foi elevada, nos isolados de piômetra, atingindo 48,4%, o que sugere que as fímbrias P podem estar envolvidas na patogenia desta afecção. Estas fímbrias foram anteriormente relacionadas com a infecção do trato urinário, tendo Wullt *et al.* (2001) verificado que isolados que expressam fímbrias P ou Prs estabelecem bacteriúria mais rapidamente e estimulam a resposta imunitária do hospedeiro. Estudos anteriores (Chen *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2009), não verificam diferenças na prevalência da região genómica correspondente ao domínio comum das fímbrias S e F1C em grupos de isolados de piômetra, de ITU e de origem fecal. Essas prevalências são, nesses estudos, atribuídas apenas às fímbrias S. No entanto, no nosso estudo, o gene *sfaS* não foi encontrado nos isolados de piômetra, atribuindo-se a elevada frequência desse domínio, exclusivamente, às fímbrias F1C. Estas fímbrias poderão ter um papel importante no desenvolvimento de piômetra em cadelas, devido à sua prevalência significativamente mais elevada nestes isolados. Apesar de, na maioria dos casos, a presença do domínio S/F1C corresponder à presença do gene *focG* ou *sfaS*, em 13,3% dos isolados, foi encontrado o domínio sem

serem detectados os genes *focG* ou *sfaS* e, em 8,9% dos isolados, um dos genes das fímbrias foi identificado, mas não o do domínio S/F1C. A existência de variáveis homólogas dos genes dos operões *foc* e *sfa*, tais como os operões *sfr*, *sfall* e *f165<sub>2</sub>* poderá contribuir para uma não correspondência de resultados, como a que foi verificada (Pawelzik, Heesemann, Hacker, & Opferkuch, 1988; Harel, Jacques, Fairbrother, Bossé, & Forget, 1995; Mitsumori, Terai, Yamamoto, & Yoshida, 1998).

A maior parte dos isolados possui vários genes que codificam para sistemas de aquisição de ferro (*fyuA*, *iucD*, *iroN*, *fepA*, *sitA* e *chuA*). À exceção da aerobactina, todos os sistemas apresentaram prevalências superiores a 53,8%. A presença de mais de um gene de sistemas de captação de ferro verificou-se em 97,5% dos isolados, sendo que 43,8% apresentou uma combinação de 5 genes de sistemas de captação de ferro. Isto reforça a função fundamental que o ferro tem no crescimento/persistência da bactéria.

A presença de vários sistemas de aquisição de ferro num mesmo isolado sugere uma redundância funcional e/ou uma vantagem para a bactéria na colonização e adaptação a diferentes ambientes. No entanto, cada sistema de aquisição de ferro, tem condições ótimas de funcionamento (Valdebenito *et al.*, 2006), e a sua utilização confere vantagem na colonização de ambientes específicos. Neste estudo, a maior prevalência dos genes *fyuA* e *chuA* em isolados de piómetra sugere que estes sistemas de aquisição de ferro estão mais bem adaptados às condições uterinas, tendo, provavelmente, um papel relevante na patogenia da doença. A yersiniabactina, além do papel na aquisição de ferro, também interfere na resposta imunitária do hospedeiro (Fetherston, Kirillina, Bobrov, Paulley, & Perry, 2010) e contribui para a formação de biofilme (Hancock, Ferrières, & Klemm, 2008).

Garcia, Brumbaugh e Mobley (2011) verificaram que, de entre vários sistemas de aquisição de ferro (*fepA*, *iroN*, *iutA*, *fyuA*, *chuA*, *hma*, entre outros), apenas os receptores do grupo heme Chua e Hma e os sideróforos aerobactina e yersiniabactina pareceram contribuir significativamente para a aquisição de ferro nas ITUs por *E. coli*. Isto deve-se, provavelmente, à sua melhor adaptação às condições e à disponibilidade de ferro nestes órgãos.

O gene *usp* apresentou uma prevalência bastante elevada e significativamente superior em isolados patogénicos (piómetra e cistite), tal como verificado noutros estudos em estirpes UPEC (Kurazono *et al.*, 2000; Siqueira *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que esteja associada à patogenicidade da *E. coli* na piómetra e na cistite. Apesar de ainda não se compreender, na totalidade, o papel da proteína codificada por este gene, pensa-se que poderá ser uma bacteriocina (Parret & De Mot, 2002).

Embora o grupo filogenético B2 tenha sido detectado nas diferentes classes de isolados, a sua prevalência foi significativamente maior nos isolados de piómetra, em relação aos restantes dois grupos. Os isolados deste grupo filogenético têm um maior potencial de

virulência, devido ao elevado número de PAIs (número média de 4,2 por isolado) e FVs (número médio de 9,8 por isolado) que possuem.

Os dois únicos isolados de piómetra do grupo filogenético A encontrados no grupo de isolados de piómetra poderão ter causado infecção devido a factores predisponentes (HQE, progestagénios, raça, etc.) ou a uma diminuição na imunidade do hospedeiro, o que leva a uma maior dificuldade do útero em eliminar bactérias menos patogénicas.

Estudos apontam o grupo filogenético B2 como o mais prevalente em estirpes patogénicas também em humanos (Bingen *et al.*, 1998; Zhang, Foxman, & Marrs, 2002; Sabaté *et al.*, 2006). No entanto, num estudo realizado em isolados uterinos de cadelas com piómetra, o grupo filogenético A foi o que apresentou maior prevalência (Ghanbarpour & Akhtardanesh, 2012). Esta divergência nos resultados de agrupamento filogenético poderá estar relacionada com diferenças geográficas, diferenças nas características da população de hospedeiros, diferenças culturais na dieta ou processamento dos alimentos, ou diferenças no método de colheita das amostras (Duriez *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

No nosso estudo, verificou-se que os grupos filogenéticos D e B2 representavam a maioria (57,7%) dos isolados de origem fecal analisados, o que está de acordo com os resultados obtidos por Harada *et al.* (2012). Com isto, poderá supor-se que as fezes caninas são reservatório de estirpes com elevado potencial patogénico, visto que o grupo B2 possui, em média, mais ilhas de patogenicidade e factores de virulência. No entanto, em humanos, os isolados de origem fecal pertencem, na sua maioria, ao grupo filogenético B1 e A (Duriez *et al.*, 2001; Sabaté *et al.*, 2006).

Estirpes pertencentes ao grupo filogenético B2 poderão ter uma maior propensão para a aquisição de PAIs e FVs (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). As PAIs I<sub>536</sub> (hemolisina- $\alpha$ , entre outros), II<sub>536</sub> (hemolisina- $\alpha$ , fímbrias relacionadas com as fímbrias P, entre outros), III<sub>536</sub> e II<sub>J96</sub> são características do grupo filogenético B2, não se encontrando em nenhum dos outros grupos. A presença destas ilhas apenas no grupo filogenético B2 poderá, também, estar relacionada com a sua aquisição posterior à separação do grupo filogenético B2 dos restantes grupos, mantendo-se estáveis e sendo transmitidas verticalmente (Johnson & Stell, 2000).

## CONCLUSÃO

Os isolados de piómetra pertenceram, na sua maioria, ao grupo filogenético B2 e apresentaram, em média, mais marcadores de PAIs e FVs que os isolados de cistite e de origem fecal.

O útero demonstra ser um ambiente difícil de colonizar, sendo necessário que a *E. coli* possua um grande número de PAIs e FVs. Contrariamente à piómetra, a cistite pode ser associada a estirpes de todos os grupos filogenéticos e com um número de FVs mais reduzido. Por outro lado, nem todos os isolados de origem fecal parecem ter potencial para induzir piómetra, embora grande parte destes pareça poder estar envolvido na colonização da bexiga.

As estirpes fecais de origem canina não deverão, no entanto, ser automaticamente consideradas comensais, uma vez que se verificou que o recto poderá funcionar como um reservatório de estirpes potencialmente patogénicas dos grupos filogenéticos B2 e D.

Este estudo permitiu a caracterização do perfil de virulência de isolados de *E. coli* associados a infecção uterina e do tracto urinário. Estudos futuros que avaliem a expressão dos FVs e não só a sua presença poderão ajudar a identificar os que na realidade são importantes no estabelecimento da piómetra e da cistite.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Arnold, S., Hubler, M., & Reichler, I. Canine pyometra: new approaches to an old disease. 2006 World congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, Praga, 11-14 Outubro 2006.
- Arora, N., Sandford, J., Browning, G. F., Sandy, J. R., & Wright, P. J. (2006). A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 66(6-7), 1530-1536.
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 249-289.
- Bergsten, G., Wullt, B., & Svanborg, C. (2005). *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 487-502.
- Beutin, L. (1999). *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Veterinary Research*, 30(2-3), 285-298.
- Bien, J., Sokolova, O., Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012. doi: 10.1155/2012/681473
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., & Denamur, E., (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(3), 642-650.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G.,...Süssmuth, R. (2004). The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biomaterials*, 17(4), 471-481.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Mora, A., Balsalobre, C., Muñoa, F.,...Blanco, J. (1997). Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Research in Microbiology*, 148(9), 745-755.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H., Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infection and Immunity*, 62(2), 606-614.
- Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, 39(11), 1673-1680.
- Bower, J. M., Eto, D. S., & Mulvey, M. A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, 6(1), 18-31.
- Boyd, E. F., & Hartl, D. L. (1998). Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1159-1165.

- Breimer, M. E., Hansson, G. C., & Leffler, H. (1985). The specific glycosphingolipid composition of human ureteral epithelial cells. *The Journal of Biochemistry*, 98(5), 1169-1180.
- Brito, B. G., Vidotto, M. C., Berbel, M. M., & Tagliari, K. C. (2004). Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. *Ciência Rural*, 34(2), 645-652.
- Brock, J. H., Williams, P. H., Licéaga, J., & Wooldridge, K. G. (1991). Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infection and Immunity*, 59(9), 3185-3190.
- Bronowski, C., Smith, S. L., Yokota, K., Corkill, J. E., Martin, H. M., Campbell, B. J.,...Winstanley, C. (2008). A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology*, 154(2), 571-583.
- Chen, Y. M. M., Wright, P. J., Lee, C. S., & Browning, G. F. (2003). Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, 94(1), 57-69.
- Chen, M., Tofighi, R., Bao, W., Aspevall, O., Jahnukainen, T., Gustafsson, L. E., ...Celsi, G. (2006). Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins. *Pediatric Nephrology*, 21(3), 382-389.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Cohn, L. A., Gary, A. T., Fales, W. H., & Madsen, R. W. (2003). Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(4), 338-343.
- Contamin, S., Galmiche, A., Doye, A., Flatau, G., Benmerah, A., & Boquet, P. (2000). The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Molecular Biology of the Cell*, 11(5), 1775-1787.
- Corrada, Y., Arias, D., Rodríguez, R., Tortora, M., & Gobello, C. (2006). Combination dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 66(6-7), 1557-1559.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology*, 55(7), 1509-1519.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P., & Coryn, M. (2002) Estrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal reproduction science*, 70(3), 251-259.
- De Cock, H., Vermeirsch, H., Ducatelle, R., & De Schepper, J. (1997). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 48(6), 1035-1047.

- De Schepper, J., Van der Stock, J., & Capiou, E. (1987). The characteristic pattern of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in the bitch with the cystic-hyperplasia-pyometra complex: effect of medical or surgical treatment. *Veterinary Research Communications*, 11(1), 65-75.
- Dhaliwal, G. K, Wray, C., & Noakes, D. E. (1998). Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). *The Veterinary Record*, 143(24), 659-661.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., & Hacker, J. (2002). Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I<sub>536</sub> to PAI IV<sub>536</sub>) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 70(11), 6365-6372.
- Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren, S. J., & Waksman, G. (2001). Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesion to its human kidney receptor. *Cell*, 105(6), 733-743.
- Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., Woodford, N., (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical Microbiology*, 50(9), 3108-3110.
- Dow, C. (1957). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record*, 69(50), 1409-1414.
- Dow, C. (1958). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record*, 70(49), 1102-1108.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G.,...Lemichez, E. (2002). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell*, 111(4), 553-564.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J.,...Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147(6), 1671-1676.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B. N., Hedhammar Å., Olson, P., & Lagerstedt, A. S. (2001). Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), 530-538.
- England, G. C. W., Freeman, S. L., & Russo, M. (2007). Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergolin and cloprostenol. *Veterinary Record*, 160(9), 293-296.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1085-1094.
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (Eds.). (2010). *Textbook of veterinary internal medicine*. (7<sup>th</sup> ed., Vol. 2). St. Louis, E.U.A.: Saunders Elsevier.
- Fabbri, A., Travaglione, S., & Fiorentini, C. (2010). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2(2), 283-296.

- Feldmann, F., Sorsa, L. J., Hildinger, K., & Schubert, S. (2007). The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infection and Immunity*, 75(6), 3183-3187.
- Féria, M. C. (2001). *Infecção do tracto urinário no cão por Escherichia coli: abordagem molecular ao diagnóstico, fisiopatologia e resistência às beta-lactaminas* (Tese de doutoramento). Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Féria, C., Machado, J., Correia, J. D., Gonçalves, J., & Gaastra, W. (2001). Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 82(1), 81-89.
- Fetherston, J. D., Kirillina, O., Bobrov, A. G., Paulley, J. T., Perry, R. D. (2010). The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infection and Immunity*, 78(5), 2045-2052.
- Fidler, I. J., Brodey, R. S., Howson, A. E., & Cohen, D. (1966). Relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to canine pyometra. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 149(8), 1043-1046.
- Fiorentini, C., Fabbri, A., Matarrese, P., Falzano, L., Boquet, P., & Malorni, W. (1997). Hindrance of apoptosis and phagocytic behaviour induced by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: two related activities in epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241(2), 341-346.
- Fischbach, M. A., Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R. J., Liu, D. R.,...Smith, K. D. (2006). The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16502-16507.
- Forrester, S. D., Troy, G. C., Dalton, M. N., Huffman, J. W., & Holtzman, G. (1999). Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(6), 557-560.
- Fransson, B. A., & Ragle, C. A. (2003). Canine pyometra: an update on pathogenesis and treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 25(8), 602-612.
- Fransson, B. A. (2003). *Systemic inflammatory response in canine pyometra; the response to uterine bacterial infection* (Tese de doutoramento). Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Suécia.
- Fukuda, S. (2001). Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. *Experimental Animals*, 50(4), 325-329.
- Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., Mobley, H. L. T. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 79(3), 1225-1235.
- Garénaux, A., Caza, M., & Dozois, C. M. (2011). The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 89-98.

- Germani, Y., Bégaud, E., Duval, P., & Le Bouguéneq, C. (1996). Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 174(5), 1124-1126.
- Ghanbarpour, R., Akhtardanesh, B. (2012). Genotype and antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* strains involved in canine pyometra. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), 737-744.
- Gobello, C., Castex, G., Klima, L., Rodríguez, R., & Corrada, Y. (2003). A study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. *Theriogenology*, 60(5), 901-908.
- Goebel, W., & Hedgpeth, J. (1982). Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 151(3), 1290-1298.
- Guyer, D. M., Kao, J., & Mobley, H. L. T. (1998). Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. *Infection and Immunity*, 66(9), 4411-4417.
- Guyer, D. M., Gunther IV, N. W., & Mobley, H. L. T. (2001). Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(Suppl 1), S32-S35.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, 23(6), 1089-1097.
- Hacker, J., & Carniel, E. (2000). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports*, 2(5), 376-381.
- Hagan, E. C. (2009). *Iron acquisition by uropathogenic Escherichia coli: ChuA and Hma heme receptors as virulence determinants and vaccine targets* (Tese de doutoramento). University of Michigan, Estados Unidos da América.
- Hagman, R., & Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 84(1-2), 143-153.
- Hagman, R. (2004). *New aspects of canine pyometra; studies on epidemiology and pathogenesis* (Tese de doutoramento). Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Suécia.
- Hagman, R., & Greko, C. (2005). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. *The Veterinary Record*, 157(7), 193-196.
- Hagman, R., Kindhal, H., & Lagerstedt, A. S. (2006). Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolite levels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 47(1), 45-68.

- Hagman, R., Reezigt, B. J., Ledin, H. B., & Karlstam, E. (2009). Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(2).
- Hagman, R., Lagerstedt, A. S., Hedhammar, Å., & Egenvall, A. (2011). A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*, 75(7), 1251-1257.
- Hancock, V., Ferrières, L., Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154(Pt 1), 167-175.
- Harada, K., Okada, E., Shimizu, T., Kataoka, Y., Sawada, T., & Takahashi, T. (2012). Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: A comparative analysis between dogs and their owners in Japan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(2), 139-144.
- Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J. M., Bossé, M., Forget, C. (1995). Cloning of determinants encoding f165<sub>2</sub> fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology*, 141(1), 221-228.
- Hedlund, M., Wachtler, C., Johansson, E., Hang, L., Somerville, E., Darveau, R. P., & Svanborg, C. (1999). P fimbriae-dependent, lipopolysaccharide-independent activation of epithelial cytokine responses. *Molecular Microbiology*, 33(4), 693-703.
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E.,...Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000305.
- Hirsh, D. C., & Zee, Y. C. (2003). *Microbiologia Veterinária* (V. J. B Terra, Trad.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. (Trabalho original publicado em 1999).
- Hoffmann, H., Hornef, M. W., Schubert, S., & Roggenkamp, A., (2001). Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(3), 227-230.
- Jacob-Dubuisson, F., Heuser, J., Dodson, K., Normark, S., & Hultgren, S. (1993). Initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins. *The EMBO Journal*, 12(3), 837-847.
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80-128.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., & Stell, A. L. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(1), 78-88.

- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J. P., Anta, M. T., & Vila, J. (2005). Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(1), 46-50.
- Jonas, D., Schultheis, B., Klas, C., Krammer, P. H., & Bhakdi, S. (1993). Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 61(5), 1715-1721.
- Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N., & Hultgren, S. J. (1995). FimH adhesion of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in *Enterobacteriaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 2081-2085.
- Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Ölschläger, T., Hacker, J. (1999). A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infection and Immunity*, 67(11), 5994-6001.
- Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Karlstam, E., & Wernersson, S. (2012). Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(Suppl 6), 337-341.
- Kehres, D. G., Janakiraman, A., Slauch, J. M., & Maguire, M. E. (2002). SitABCD is the alkaline Mn<sup>2+</sup> transporter of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 184(12), 3159-3166.
- Khan, A. S., Kniep, B., Oelschlaeger, T. A., Van Die, I., Korhonen, T., & Hacker, J. (2000). Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3541-3547.
- Kida, K., Baba, E., Torii, R., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V....Inaba, T. (2006). Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. *Theriogenology*, 66(5), 1325-1333.
- Klemm, P., Ørskov, I., & Ørskov, F. (1982). F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. *Infection and Immunity*, 36(2), 462-468.
- Kogika, M. M. Recommendations for management of urinary tract infection in dogs. 2009 World small animal veterinary congress WSAVA, São Paulo, 21-24 Julho 2009.
- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F....Mäkelä, P. H. (1985). Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity*, 48(2), 486-491.
- Korhonen, T. K., Parkkinen, K., Hacker, J., Finne, J., Pere, A., Rhen, M., & Holthöfer, H. (1986). Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium. *Infection and Immunity*, 54(2), 322-327.
- Krekeler, N., Marena, M. S., Browning, G. F., Holden, K. M., Charles, J. A., Wright, P. J. (2013). The role of type 1, p and s fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. *Veterinary Microbiology*, 164(3-4), 399-404.

- Kurazono, H., Yamamoto, S., Nakano, M., Nair, G. B., Terai, A., Chaicumpa, W., & Hayashi, H. (2000). Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microbial Pathogenesis*, 28(3), 183-189.
- Labigne-Roussel, A. F., Lark, D., Schoolnik, G., & Falkow, S. (1984). Cloning and expression of an afimbrial adhesion (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 46(1), 251-259.
- Labigne-Roussel, A., & Falkow, S. (1988). Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (afa) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infection and Immunity*, 56(3), 640-648.
- Lalioui, L., Jouve, M., Gounon, P., & Le Bouguéneq, C. (1999). Molecular cloning and characterization of the afa-7 and afa-8 gene clusters encoding afimbrial adhesions in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infection and Immunity*, 67(10), 5048-5059.
- Le Bouguéneq, C., Garcia, M. I., Ouin, V., Desperrier, J. M., Gounon, P., & Labigne, A. (1993). Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesions expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. *Infection and Immunity*, 61(12), 5106-5114.
- Le Bouguéneq, C., Lalioui, L., Du Merle, L., Jouve, M., Courcoux, P., Bouzari, S.,...Garcia, M. I. (2001). Characterization of afaE adhesions produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of afa adhesions that do or do not recognize dr blood group antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1738-1745.
- Leffler, H., & Svanborg-Edén, C. (1981). Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infection and Immunity*, 34(3), 920-929.
- Li, B., Sun, J., Han, L., Huang, X., Fu, Q., Ni, Y. (2010). Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6698-6700.
- Ling, G. V., Norris, C. R., Franti, C. E., Eisele, P. H., Johnson, D. L., Ruby, A. L., & Jang, S. S. (2001). Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(4), 341-347.
- Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D., Mobley, H. L. T. (2009). Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3469-3481.
- Maiti, S. N., Harel, J., & Fairbrother, J. M. (1993). Structure and copy number analyses of pap-, sfa-, and afa- related gene clusters in F165-positive bovine and porcine *Escherichia coli* isolates. *Infection and Immunity*, 61(6), 2453-2461.
- Marre, R., Hacker, J., Henkel, W., & Goebel, W. (1986). Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infection and Immunity*, 54(3), 761-767.

- Marre, R., Kreft, B., & Hacker, J. (1990). Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubular cells. *Infection and Immunity*, *58*(10), 3434-3437.
- Mellata, M., Ameiss, K., Mo, H., & Curtiss III, R. (2010). Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* X7122 (O78:K80:H9). *Infection and Immunity*, *78*(4), 1528-1541.
- Meyers-Wallen, V. N., Goldschmidt, M. H., & Flickinger, G. L. (1986). Prostaglandin F2 $\alpha$  treatment of canine pyometra. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *189*(12), 1557-1561.
- Middendorf, B., Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Mühlendorfer, I., Salge, S., Hacker, J. (2001). The pathogenicity islands (PAIs) of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536: island probing of PAI II<sub>536</sub>. *The Journal of Infectious Diseases*, *183*(Suppl 1), S17-S20.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hacker, J. (2004). Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *Journal of Bacteriology*, *186*(10), 3086-3096.
- Mills, M., Meysick, K. C., & O'Brien, A. D. (2000). Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infection and Immunity*, *68*(10), 5869-5880.
- Mitsumori, K., Terai, A., Yamamoto, S., Yoshida, O. (1998). Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesions in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *21*(4), 261-268.
- Miyazaki, J., Ba-Thein, W., Kumao, T., Yasuoka, M. O., Akaza, H., & Hayashi, H. (2002). Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesion I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *33*(1), 23-26.
- Moriel, D. G., Rosini, R., Seib, K. L., Serino, L., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2012). *Escherichia coli*: great diversity around a common core. *mBio*, *3*(3), e00118-12.
- Nagy, B., Tóth, I., & Fekete, P. Z. (2005). Adhesins and receptors for colonization by different pathotypes of *Escherichia coli* in calves and young pigs. In Holzapfel, W. H. & Neughton, P. J. (Eds.), *Microbial ecology in growing animals* (pp. 176)
- Nelson, R. W., Feldman, E. C., & Stabenfeldt, G. H. (1982). Treatment of canine pyometra and endometritis with prostaglandin F2 $\alpha$ . *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *181*(9), 899-903.
- Nelson, R. W., & Couto, C. G. (Eds.). (2003). *Small animal internal medicine* (3<sup>rd</sup> ed.). St. Louis, E.U.A.: Mosby
- Nicaud, J. M., Mackman, N., Gray, L., & Holland, I B. (1985). Characterization of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from E. coli 2001. *FEBS Letters*, *187*(2), 339-344.
- Nishikawa, Y. (1985). Adherence of *Escherichia coli* in pathogenesis of endometritis and effects of estradiol examined by scanning electron microscopy. *Infection and immunity*, *47*(1), 318-321.

- Nishikawa, Y., & Baba, T. (1985). In vitro adherence of *Escherichia coli* to endometrial epithelial cells of rats and influence of estradiol. *Infection and immunity*, 50(2), 506-509.
- Niskanen, M., & Thrusfield, M. V. (1998). Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *Veterinary Record*, 143(18), 493-498.
- Nowicki, B., Truong, L., Moulds, J., & Hull, R. (1988). Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *American Journal of Pathology*, 133(1), 1-4.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S., & Moulds, J. (1990). The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesions AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infection and Immunity*, 58(1), 279-281.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., & Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(6), 517-521.
- Onclin, K., Murphy, B., Verstegen, J.P. (2002). Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*, 57(8), 1957-1972.
- Ott, M., & Hacker, J. (1991). Analysis of the variability of s-fimbriae expression in an *Escherichia coli* pathogen. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 63(2-3), 233-238.
- Parret, A. H. A., & De Mot, R. (2002). *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology*, 148(Pt 6), 1604-1606.
- Pawelzik, M., Heesemann, J., Hacker, J., Opferkuch, W. (1988). Cloning and characterization of a new type of fimbria (S/F1C-related fimbria) expressed by *Escherichia coli* O75:K1:H7 blood culture isolate. *Infection and Immunity*, 56(11), 2918-2924.
- Pelander, L., Hagman, R., & Häggström, J. (2008). Concentrations of cardiac Troponin I before and after ovariohysterectomy in 46 female dogs with pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(35).
- Peterson, J. W. (1996). Bacterial pathogenesis. In S. Baron (Ed.), *Medical microbiology*. Galveston, Estados Unidos da América: University of Texas Medical Branch.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E.,...Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546-553.
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Hacker, J., Jann, K., & Kim, K. S. (1993). Adhesion of s-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene-encoded protein of s-fimbriae. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10356-10363.
- Pretzer, S. D. (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, 70(3), 359-363.

- Qin, X., Hu, F., Wu, S., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y., Wang, M. (2013). Comparison of adhesion genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS One*, 8(4), e61169.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. West Sussex (2<sup>a</sup> ed.). Reino Unido: Willey-Blackwell.
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.
- Rakin, A., Noelting, C., Schubert, S., & Heesemann, J. (1999). Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5265-5274.
- Rasko, D. A., Phillips, J. A., Li, X., & Mobley, H. L. T. (2001). Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 1041-1049.
- Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 881-941.
- Riegman, N., Kusters, R., Van Veggel, H., Bergmans, H., Van Bergen en Henegouwen, P.,...Van Die, I. (1990). F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the foc gene cluster and identification of minor subunits. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 1114-1120.
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753-1754.
- Russo, T. A., McFadden, C. D., Carlino-MacDonald, U. B., Beanan, J. M., Barnard, T. J., & Johnson, J. R. (2002). IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 70(12), 7156-7160.
- Russo, T. A., Davidson, B. A., Genagon, S. A., Warholc, N. M., MacDonald, U., Pawlicki, P. D.,...Knight, P. R. (2005). E. coli virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(2), L207-L216.
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., & Andreu, A., Prats, G. (2006). Pathogenicity Island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 880-886.
- Salminen, A., Loimaranta, V., Joosten, J. A. F., Khan, A., S., Hacker, J., Pieters, R. J., & Finne, J. (2007). Inhibition of p-fimbriated *Escherichia coli* adhesion by multivalent galabiose derivatives studied by a live-bacteria application of surface plasmon resonance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60(3), 495-501.

- Sauerwein, H., Brandstetter, A., Pfaffl, W. M., Meyer, H. H., Möstl, E., Handler, J., & Arbeiter, K. (1998). Uterine androgen receptor mRNA expression in metestrous and anestrous bitches being healthy or suffering from pyometra. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 105(5), 191-193.
- Schilling, J. D., Mulvey, M. A., Vincent, C. D., Lorenz, R. G., & Hultgren, S. J. (2001a). Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 166(2), 1148-1155.
- Schilling, J. D., Mulvey, M. A., & Hultgren, S. J. (2001b). Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(Suppl 1), S36-S40.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., & Heesemann, J. (1998). Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 66(2), 480-485.
- Schubert, S., Rakin, A., Heesemann, J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island (hpi): evolutionary and functional aspects. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3), 83-94.
- Seguin, M. A., Vaden, S. L., Altier, C., Stone, E., & Levine, J. F. (2003). Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(5), 622-631.
- Senior, D. Urinary tract infection. 2006 World congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, Praga, 11-14 Outubro 2006.
- Seshasayee, A. S. N (2009). *A computational study of bacterial gene regulation and adaptation on a genomic scale* (Tese de doutoramento). St. John's College – University of Cambridge, Reino Unido.
- Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. S., Tiba, M. R., Moura, C., Lopes, M. D.,...Silva, A. V. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 206-210.
- Skaar, E. P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1000949.
- Smith, F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), 610-612.
- Smith, Y. C., Grande, K. K., Rasmussen, S. B., & O'Brien, A. D. (2006). Novel three-dimensional organoid model for evaluation of the interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with terminally differentiated human urothelial cells. *Infection and Immunity*, 74(1), 750-757.
- Smith, Y. C., Rasmussen, S. B., Grande, K. K., Conran, R. M., O'Brien, A. D. (2008). Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation in mice. *Infection and Immunity*, 74(7), 2978-2990.

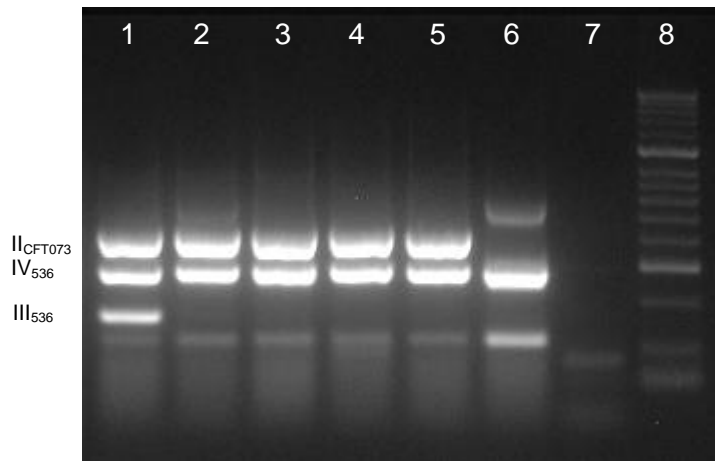
- Sokurenko, E. V., Courtney, H. S., Ohman, D. E., Klemm, P., & Hasty, D. L. (1994). FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *Journal of Bacteriology*, 176(3), 748-755.
- Stone, E. A., Littmann, M. P., Robertson, J. L., & Bovée, K. C. (1988). Renal dysfunction in dogs with pyometra. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(4), 457-464.
- Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, ... Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), 619-627.
- Swenson, D. L., Bukanov, N. O., Berg, D. E., & Welch, R. A. (1996). Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infection and Immunity*, 64(9), 3736-3743.
- Teng, C. T., Beard, C., & Gladwell, W. (2002). Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat and hamster. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1439-1449.
- Thompson, M. F., Litster, A. L., Platell, J. L., & Trott, D. J. (2011). Canine bacterial urinary tract infections: new developments in old pathogens. *The Veterinary Journal*, 190(1), 22-27.
- Todar, K. (2008). Pathogenic *E. coli*. Retirado de [http://textbookofbacteriology.net/e.coli\\_1.html](http://textbookofbacteriology.net/e.coli_1.html)
- Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity*, 69(10), 6179-6185.
- Tourret, J., Diard, M., Garry, L., Matic, I., Denamur, E. (2010). Effects of single and multiple pathogenicity island deletions on uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 intrinsic extra-intestinal virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(7), 435-439.
- Tramuta, C., Nucera, D., Robino, P., Salvarani, S., & Nebbia, P. (2011). Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 49-55.
- Valdebenito, M., Bister, B., Reissbrodt, R., Hantke, K., & Winkelmann, G. (2005). The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(2), 99-107.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A. L., Winkelmann, G., & Hantke, K. (2006). Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(8), 513-520.
- Verstegen, J., Dhaliwal, G., & Verstegen-Onclin, K. (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70(3), 364-374.

- Ververidis, H. N., Boscós, C. M., Stefanakis, A., Saratsis, P., Stamou, A. I., & Krambovitis, E. (2004). Serum estradiol-17 $\beta$ , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, 62(3), 614-623.
- Virkola, R., Westerlund, B., Holthöfer, H., Parkkinen, J., Kekomäki, M., & Korhonen, T. K. (1988). Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesions in human urinary bladder. *Infection and Immunity*, 56(10), 2615-2622.
- Wadås, B., Kühn, I., Lagerstedt, A. S., & Jonsson, P. (1996). Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: comparison of isolates isolated from bitches suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from faeces of healthy dogs. *Veterinary Microbiology*, 52(3-4), 293-300.
- Weese, J. S., Blondeau, J. M., Boothe, D., Breitschwerdt, E. B., Guardabassi, L., Hillier, A.,...Sykes, J. E. (2011). Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Veterinary Medicine International*. 2011. doi:10.4061/2011/263768
- Welch, R. A., & Falkow, S. (1984). Characterization of *Escherichia coli* hemolysins conferring quantitative differences in virulence. *Infection and Immunity*, 43(1), 156-160.
- Whitehead, M. L. (2008). Risk of pyometra in bitches treated for mismating with low doses of oestradiol benzoate. *Veterinary Record*, 162(23), 746-749.
- Williams, P. H., & Carbonetti, N. H. (1986). Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 51(3), 942-947.
- Wroblewska-Seniuk, K., Selvarangan, R., Hart, A., Pladzyk, R., Goluszko, P., Jafari, A.,...Nowicki, B. (2005). Dra/AfaE adhesion of uropathogenic Dr/Afa<sup>+</sup> *Escherichia coli* mediates mortality in pregnant rats. *Infection and Immunity*, 73(11), 7597-7601.
- Wullt, B., Bergsten, G., Samuelsson, M., Gebretsadik, N., Hull, R., Svanborg, C. (2001). The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(Suppl 1), S43-S46.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12(2), 85-90.
- Yamamoto, S., Nakano, M., Terai, A., Yuri, K., Nakata, K., Nair, G. B.,...Ogawa, O. (2001). The presence of the virulence island containing the usp gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *The Journal of Urology*, 165(4), 1347-1351.
- Yuri, K., Nakata, K., Katae, H., Yamamoto, S., & Hasegawa, A. (1998). Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60(3), 287-290.
- Zhang, L., Foxman, B., Marrs, C. (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 3951-3955.

Ørskov, I., Edén, C. S., & Ørskov, F. (1988). Aerobactin production of serotyped *Escherichia coli* from urinary tract infections. *Medical Microbiology and Immunology*, 177(1), 9-14.

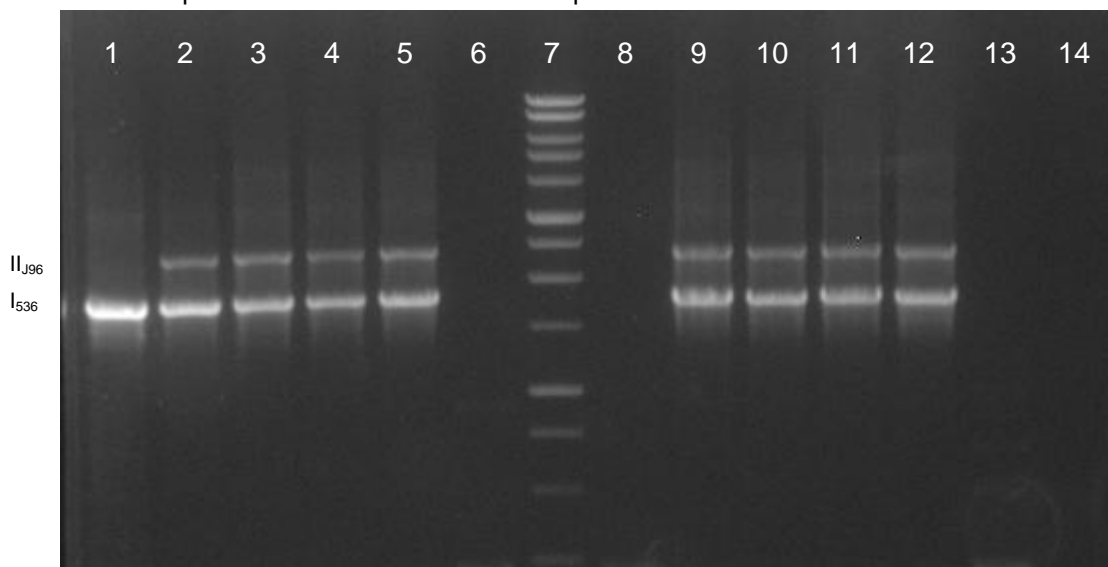
## ANEXOS

### Anexo 1 – Exemplo de resultado de PCR do Multiplex A



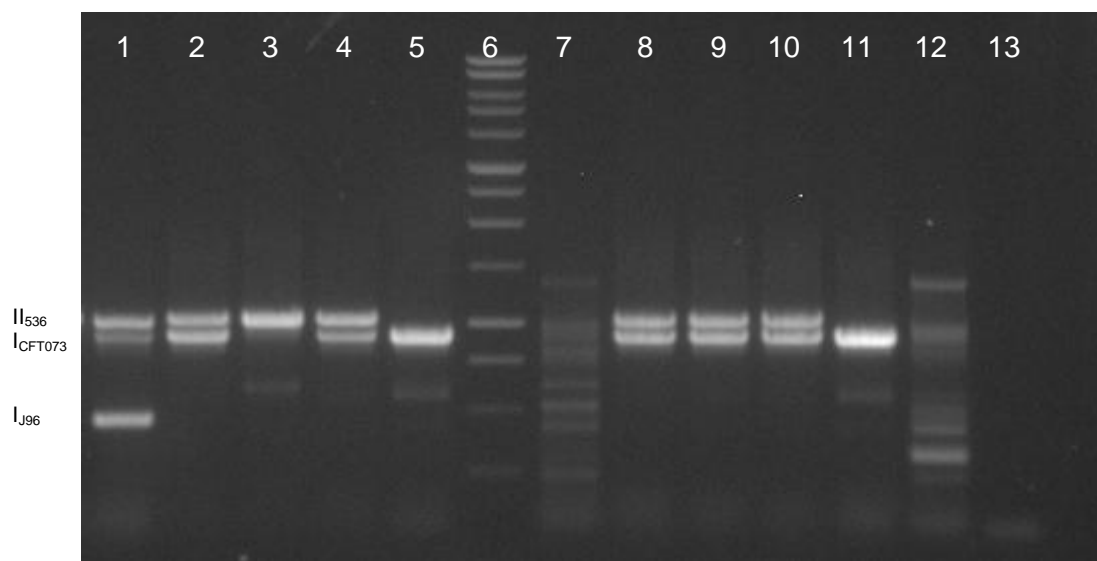
Legenda: 1 – Controlo positivo *E. coli* 536, 2 – Controlo positivo *E. coli* J96, 3-5 – Isolados positivos para os marcadores das PAIs II<sub>CFT073</sub> e IV<sub>536</sub>, 6 – Isolado positivo para o marcador da PAI IV<sub>536</sub>, 7 – Controlo negativo, 8 – Marcador de pesos moleculares

### Anexo 2 – Exemplo de resultado de PCR do Multiplex B1



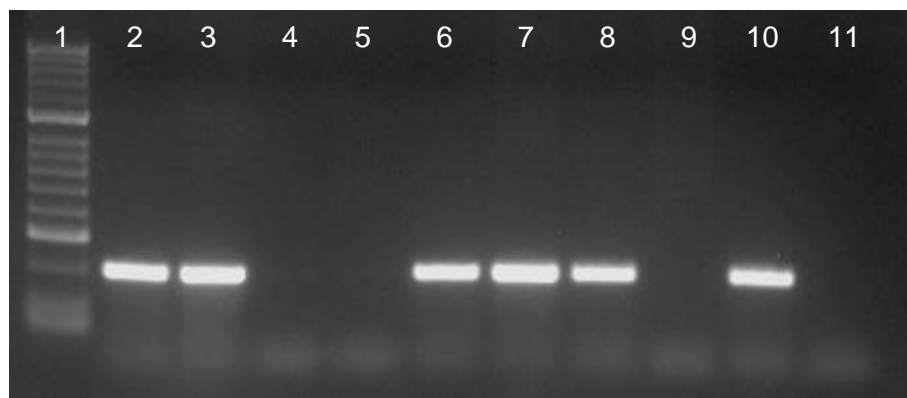
Legenda: 1 – Controlo positivo *E. coli* 536, 2 – Controlo positivo *E. coli* J96, 3-5 – Isolados positivos para os marcadores das PAIs II<sub>J96</sub> e I<sub>536</sub>, 6 – Isolado negativo para ambos os marcadores, 7 – Marcador de pesos moleculares, 8 – Isolado negativo para ambos os marcadores, 9-12 - Isolados positivos para os marcadores das PAIs II<sub>J96</sub> e I<sub>536</sub>, 13 – Isolado negativo para ambos os marcadores, 14 – Controlo negativo

### Anexo 3 – Exemplo de resultado de PCR do Multiplex B2



Legenda: 1 – Controlo positivo *E. coli* J96, 2 – Isolado positivo para os marcadores das PAIs II<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub>, 3 – Isolado positivo para o marcador da PAI II<sub>536</sub>, 4 – Isolado positivo para os marcadores das PAIs II<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub>, 5 – Isolado positivo para o marcador da PAI I<sub>CFT073</sub>, 6 – Marcador de pesos moleculares, 7 – Isolado negativo para todos os marcadores, 8-10 – Isolados positivos para os marcadores das PAIs II<sub>536</sub> e I<sub>CFT073</sub>, 11 – Isolado positivo para o marcador da PAI I<sub>CFT073</sub>, 12 – Isolado negativo para todos os marcadores, 13 – Controlo negativo

### Anexo 4 – Exemplo de resultado de PCR de detecção de um gene de factores de virulência (*iroN*)



Legenda: 1 – Marcador de pesos moleculares, 2-3 – Isolados positivos para o gene, 4-5 – Isolados negativos para o gene, 6-8 – Isolados positivos para o gene, 9 – Isolado negativo para o gene, 10 – Controlo positivo *E. coli* ATCC 25922, 11 – Controlo negativo