



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSADORAS
DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS**

FABIANA SANTOS CASTRO

PORTO ALEGRE

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSADORAS
DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS**

Autora: Fabiana Santos Castro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Coorientador: Ivan Cunha Bustamante Filho

PORTO ALEGRE

2024

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Castro, Fabiana Santos

CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI CAUSADORAS DE ÊNDOMETRITE NAS ÉGUAS / Fabiana Santos Castro. -- 2024.

60 f.

Orientador: Rodrigo Costa Mattos.

Coorientador: Ivan Cunha Bustamante Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Endometrite. 2. Escherichia Coli. 3. fatores de virulência. 4. éguas. I. Mattos, Rodrigo Costa, orient. II. Filho, Ivan Cunha Bustamante, coorient. III. Título.

Fabiana Santos Castro

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI CAUSADORAS DE
ENDOMETRITE EM ÉGUAS**

Aprovada em 27 AGO 2024

APROVADO POR:

Rodrigo Costa Mattos

**Prof. Dr.
Orientador e Presidente da Comissão**

Nélson Alexandre Kretzmann Filho

**Prof. Dr.
Membro da Comissão**

Monica Jachetti Maciel

**Prof. Dr.
Membro da Comissão**

Monique de Albuquerque Lagares

**Prof. Dr.
Membro da Comissão**

Agradeço a Deus que me deu forças para concluir este projeto de forma satisfatória

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Agradeço ao meu Orientador, Rodrigo Costa Mattos, que me possibilitou esse grande desafio. Ao meu coorientador Ivan Bustamante Filho, pela ajuda desde o início do experimento, e pelos ensinamentos para realização e compreensão na parte dos materiais e métodos. De aprender todo o processo do princípio ao fim, sem enviar para terceiros a finalização, assim me tornando profissional apta para realização de trabalhos em laboratório.

Agradecer a todas as eguas que contribuíram para que fosse concluído esse trabalho, e que tiveram todo o carinho e cuidado todos esses anos.

Obrigada também ao laboratório de Reprodução Animal, REPROLAB-UFRGS, por ser minha segunda casa desde de quando fui bolsista de salão de iniciação científica de 2003 a 2008. Onde me preparei para a vida profissional depois de formada. Agradeço aos estagiários que contribuíram para a finalização desse projeto.

Agradecimento a minha família, pela compreensão de minhas ausências e viagem para conclusão desse doutorado. Assim como apoio mediante falta de suporte ao finalizar a bolsa.

Um agradecimento especial ao laboratório de biotecnologia da UNIVATES, onde estive grande parte realizando meu experimento, tive muito suporte, principalmente pela Amanda, Leticia, Ana, Jayse, eternamente grata.

Aos meus amigos Barbara, Monica, por estarem sempre ao meu lado durante esses anos. Agradecer também, especialmente a Luana, uma grande amiga, que me deu bastante apoio. E também ao João que chegou nessa última etapa e estando sempre ao meu lado.

E por fim, agradeço à UFRGS que durante o período da graduação, me abriu portas para o conhecimento, e contribuindo a ser a profissional que sou hoje.

E claro a Deus, pela minha fé de nunca desistir, apesar dos obstáculos.

“Não sabia que era impossível , foi lá e fez”

CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSADORAS DE ENDOMETRITE NAS ÉGUAS

RESUMO

O papel da *Escherichia coli* na patogenia da endometrite equina é em grande parte desconhecida. Sugere-se que a *E. coli* induz uma resposta inflamatória menos exsudativa e provoca uma maior lesão no tecido endometrial do que *S. zooepidemicus*. Além disso as infecções por *E. coli* são relatadas como as mais problemáticas a resolver. Dessa forma, a determinação de fatores de virulência da *E. coli* pode ser um ponto fundamental para caracterizar cepas que induzam uma maior resposta inflamatória e de que forma a sua composição antigênica tenha um comportamento de autodefesa, tornando-a difícil de ser isolada e até mesmo eliminadas do ambiente uterino por mecanismos de defesas celulares. Dessa forma os objetivos do trabalho foi verificar a ocorrência de genes de virulência e toxicidade em isolados de *E. coli*. Comparar a frequência dos genes de virulência *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *ehxA*, *hlyA*, *iuc*, *ibeA*, *fimH*, *kpsMII* em amostras de *E. coli* isoladas do útero, de fezes e da vulva; estabelecer relação entre a presença de *E. coli*, com a sintomatologia clínica e seus fatores de virulência 24 horas após infecção experimental em éguas. Além de verificar a produção de biofilme *in vitro*, e identificação dos filogrupos patogênicos e não patogênicos das *E. coli* isoladas. Dessa forma, em relação à porcentagem de presença de cada gene estudado: *Stx1* (28,57%); *Stx2* (57,14%); *eaeA* (14,28%); *ehxA* (14,28%); *hlyA* (28,57%); *iuc* (28,57%); *ibeA* (14,28%); *fimH* (85,71%); *KpsMII* (14,28%). cepa I - *iuc*; cepa II - *stx2*, *hlyA* e *fimH*; cepa III - *stx2* e *fimH*; cepa IV - *Stx1*, *eaeA*, *iuc* e *fimH*; cepa V cepa *Stx2*, *hlyA*, *ibeA*, *fimH*, *KpsMII*; a cepa VI apresentou somente o gene *fimH*; e a cepa VII identificou os genes *Stx1*, *Stx2*, *ehxA*, *fimH*. Na formação de biofilme *in vitro*, a cepa VI teve leve produção de biofilme, e cepa V produção forte de biofilme, além de possuir maior número de genes do estudo (*hlyA*, *Stx2*, *fimH*, *kpsMII*, *ibeA*). Estas cepas isoladas foram inoculadas experimentalmente em 6 éguas diferentes, clinicamente normais com exame citológico e bacteriológicos negativos. Um dia após a infecção, foi realizado exame clínico do trato genital incluindo, ultrassonografia, citologia endometrial e bacteriologia. A endometrite causada pelas *E. coli* provocou citologia positiva e as éguas desenvolveram sinais clínicos vaginais de endometrite e líquido uterino. O gene do fator de virulência *fimH* foi o mais prevalente e o mais significativo, entre as *E. coli* na infecção intrauterina equina. No entanto, somente a cepa com presença do gene *KpsMII*, apresentou forte produção de biofilme. Na interpretação do grupo filogenico das amostras de *E. coli* estudadas, a maioria das cepas fazem parte do grupo A e B1, dessa forma, denominadas por cepas comensais. Os dados apresentados neste trabalho indicam que isolados de *E. coli* recuperados do útero de éguas apresentam ampla diversidade genética. Mesmo que a maioria das cepas de *E. coli* estudadas façam parte do grupo filogenico de comensais, éguas que não apresentaram presença de líquido, e crescimento bacteriano, não é indicativo de égua saudável, devido à presença de neutrófilos no exame citológico, o que pode ser devido a produção de biofilme dessas cepas.

Palavras-chave: genes, biofilme; virulência; filogrupos.

GENETIC CHARACTERIZATION OF ESCHERICHIA COLI STRAINS CAUSING ENDOMETRITIS IN MARES

ABSTRACT

The role of Escherichia coli in the pathogenesis of equine endometritis is largely unknown. It is suggested that E. coli induces a less exudative inflammatory response and causes greater damage to the endometrial tissue compared to Streptococcus zooepidemicus. Moreover, E. coli infections are reported as the most challenging to resolve. Therefore, determining the virulence factors of E. coli may be crucial to characterize strains that induce a greater inflammatory response and how their antigenic composition exhibits self-defense behavior, making them difficult to isolate and even eliminate from the uterine environment by cellular defense mechanisms. Thus, the objectives of the study were to verify the occurrence of virulence and toxicity genes in E. coli isolates, compare the frequency of virulence genes Stx1, Stx2, eaeA, ehxA, hlyA, iuc, ibeA, fimH, kpsmII in samples of E. coli isolated from the uterus, feces, and vulva, establish a relationship between the presence of E. coli, clinical symptoms, and their virulence factors 24 hours after experimental infection in mares. Additionally, the study aimed to assess biofilm production in vitro and identify the pathogenic and non-pathogenic phylogroups of the isolated E. coli. The results showed the following percentages of gene presence: Stx1 (28.57%); Stx2 (57.14%); eaeA (14.28%); ehxA (14.28%); hlyA (28.57%); iuc (28.57%); ibeA (14.28%); fimH (85.71%); KpsMII (14.28%). Strain I - iuc; Strain II - stx2, hlyA, and fimH; Strain III - stx2 and fimH; Strain IV - Stx1, eaeA, iuc, and fimH; Strain V - Stx2, hlyA, ibeA, fimH, KpsMII; Strain VI presented only the fimH gene; and Strain VII identified the genes Stx1, Stx2, ehxA, fimH. In in vitro biofilm formation, Strain VI showed slight biofilm production, and Strain V exhibited strong biofilm production, in addition to having the highest number of genes studied (hlyA, Stx2, fimH, kpsmII, ibeA). These isolated strains were experimentally inoculated into 6 different mares, which were clinically normal with negative cytological and bacteriological exams. One day after infection, a clinical examination of the genital tract, including ultrasonography, endometrial cytology, and bacteriology, was performed. Endometritis caused by E. coli resulted in positive cytology, and the mares developed clinical signs of vaginal endometritis and uterine fluid. The fimH virulence factor gene was the most prevalent and significant among E. coli in equine intrauterine infection. However, only the strain with the KpsMII gene showed strong biofilm production. In the interpretation of the phylogenetic group of the E. coli samples studied, most belong to groups A and B1, thus classified as commensal strains. The data presented in this work indicate that E. coli isolates recovered from the uterus of mares exhibit a wide genetic diversity. Even though most of the strains studied belong to the commensal phylogenetic group, mares without fluid presence or bacterial growth are not necessarily healthy, due to the presence of neutrophils in the cytological exam, which may be due to biofilm production by these strains.

Keywords: genes; biofilm, virulence; phylogroups.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorvância
A/E	<i>Attaching and effacing lesion</i>
APEC	<i>Avian pathogenic Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> patogénica aviária)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
DAEC	<i>Diffusely Adherent E. coli</i> (<i>E. coli</i> de aderência difusa)
DEC	<i>Diarrhoeagenic Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> diarreiogénica)
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (desoxirribonucleósidos trifosfatos)
eae	Gene que codifica a proteína intimina
EAEC	<i>Enteroggregative E. coli</i> (<i>E. coli</i> enteroagregativa)
EAST1	<i>Enteroggregative heat-stable toxin 1</i> (toxina enteroagregativa termoestável 1)
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> (<i>E. coli</i> enterohemorrágica)
EHXA	Enterohemolisina
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i> (<i>E. coli</i> enteroinvasiva)
ENPEC	<i>Endometrial Pathogenic E. coli</i> (<i>E. coli</i> patogénica endometrial)
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i> (<i>E. coli</i> enteropatogénica)
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i> (<i>E. coli</i> enterotoxinogénica)
ExPEC	<i>Extracellular Pathogenic E. coli</i> (<i>E. coli</i> patogénica extracelular)
FimH	<i>Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin</i>
Fvs	<i>fatores de virulência</i>
hlyA	<i>Gene que codifica a enterohemolisina</i>
IBEA	<i>Invasin of Adherent</i>
LPS	<i>Lipopolissacárido</i>
LT	<i>Heat-labile toxin</i> (toxina termo-lábil)
MNEC	<i>Meningitis-associated E. coli</i> (<i>E. coli</i> associada a meningites)
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (tampão fosfato)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PMN	<i>Polimorfonucleares</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> (enzima transcriptase reversa)
SDS	<i>Dodecil Sulfato de Sódio</i>
SSC	<i>Sodium Saline Chloride Citrate Buffer</i> (Tampão de citrato de sódio salino)
ST	<i>Heat-stable toxin</i> (toxina termo-estável)
STEC	<i>Shigella Toxin E. coli</i> (<i>E. coli</i> produtora da toxina de <i>Shigella</i>)
Stx	<i>Shiga-like toxin</i>

stx	Gene que codifica a toxina Stx (VT)
Taq	<i>Thermus Aquaticus Thermostable DNA polymerase</i> (Polimerase de DNA termorresistente)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TES	Solução de Tris/ EDTA
TE1	<i>extrato enzimático produzido por A. niger T000507-2 em FES</i>
TSB	<i>Tryptone Soya Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli (E. coli uropatogénica)</i>
UTIs	<i>Urinary tract infections</i> (infecções do trato urinário)
VT	Verotoxina (Stx)

LISTA DE SÍMBOLOS

g	<i>força centrífuga</i>
M	molaridade
kDa	KiloDalton
mM	milimol
ml	mililitro
pb	pares de bases
%	<i>Porcentagem</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μM	<i>Micron</i>

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas na revisão bibliográfica

Figura 1	Citologia endometrial em éguas coradas com coloração tipo romanowsky ($\times 100$). (a) citologia endometrial negativa; presença de células do epitélio do endométrio, ausência de células inflamatórias. (b) citologia endometrial positiva; poucas células	18
Figura 2	Edema endometrial exacerbado com extravasamento e acúmulo de líquido intraluminal (*) em uma égua com endometrite e acúmulo de líquido intraluminal hiperecogênico extenso (**) em uma égua com endometrite. Barras de escala 10 mm	18
Figura 3	Prevalência de microrganismos isolados de swabs de cultura obtidos de éguas puro-sangue residentes em fazendas visitadas rotineiramente na região central kentucky (n = 498). *os não- patógenos incluem streptococcus, bacillus e micrococcus; e + s: (Le Blanc, 2007)	19
Figura 4	Representação esquemática de várias funções do polissacarídeo capsular bacteriano Gram-negativo(Sachdeva et al, 2017)	27
Figura 5	Tabela de classificação de filogrupos de acordo com a presença/ausência dos genes-alvo (Moez, et al., 2020)	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRITE.....	16
2.2	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL.....	17
2.3	ESCHERICHIA COLI.....	20
2.3.1	Características	20
2.3.2	Patogênese	21
2.3.2.1	Produção de biofilme	21
2.3.3	Endometrite	22
2.3.4	Genes de Virulência	23
2.3.4.1	<i>hlyA</i>	23
2.3.4.2	Toxina <i>Shiga</i>	24
2.3.4.3	<i>ehxA</i>	24
2.3.4.4	<i>eaeA</i>	25
2.3.4.5	<i>fimH</i>	25
2.3.4.6	<i>iucD</i>	26
2.3.4.7	<i>kpsm II</i>	26
2.3.4.8	<i>ibeA</i>	27
3	ARTIGO	30
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Os investimentos em pesquisa com equinos estão relacionados às perspectivas dos segmentos da indústria equina. As pesquisas podem ser discriminadas como sendo em produção e manejo, genética e melhoramento, nutrição e alimentação, reprodução, medicina e cirurgia, doenças, sanidade e defesa sanitária (Almeida,2010).

A endometrite tem sido apontada como a maior causa de infertilidade nas éguas (Brinsko *et al.*, 2011). As endometrites bacterianas são consideradas como das maiores causas de infertilidade na espécie equina (Hughes; Loy, 1975). A contaminação do trato genital da égua pode ocorrer em três situações: monta natural, exame ginecológico, ou parto (Ricketts; Macintos, 1987; Castilho, 1994).

Os patógenos causadores dessa infecção uterina são introduzidos nos órgãos reprodutivos mais frequentemente logo após o parto, quando colo uterino aberto permite que os microrganismos passem da vagina para o útero; assim como, os líquidos retidos (líquido amniótico, porções da placenta) são um substrato adequado para a multiplicação de patógenos; e durante o estro, quando o útero pode estar contaminado com esmegma durante a monta natural (Benko, 2015).

Problemas anatômicos assim como fisiológicos da égua podem também favorecer o aparecimento de patógenos e seu crescimento intrauterino, como a contração miometrial comprometida e sua atividade reduzida levando ao acúmulo de líquido intrauterino e, juntamente com a opsonização disfuncional, resultará em falha da fagocitose de patógenos. De acordo com Christoffesen (2012) parecem ser os principais contribuintes para a suscetibilidade à endometrite persistente.

Éguas de baixa resistência a inflamações persistentes tendem a ter as seguintes bactérias mais comumente isoladas do útero: a *Streptococcus* β -hemolítico (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (LeBlanc, 2007).

Dentre dessas bactérias citadas, a *Escherichia coli* foi considerada, por muito tempo, um microrganismo não-patogênico, no entanto com o passar do tempo, alguns sorogrupos começaram a ser associados a diversas patologias no homem e em animais. A patogenicidade das cepas de *E.coli* está relacionada com a cumulatividade dos mecanismos de virulência e que podem ser multifatoriais (Rocha, 2008). Portanto, algumas cepas de *E. coli* possuem fatores de virulência variados que lhes conferem a habilidade de colonizar novos sítios e causar um amplo espectro de doenças intestinais e extra intestinais. (Croxen, 2010; Nunes, 2016)

A determinação de fatores de virulência das *E. coli* pode ser um ponto fundamental para caracterizar cepas que induzam uma maior resposta inflamatória e que de acordo com sua

composição antigênica capsular, flagelar ou somática tenham um comportamento de autodefesa, tornando-as difíceis de serem isoladas e até mesmo eliminadas do ambiente uterino por mecanismos de defesas celulares. A partir desta caracterização, poder-se-iam determinar, inclusive, tratamentos mais eficazes para a endometrite causada por *Escherichia coli* (Camoatto, 2014).

As características genéticas e fenotípicas da *E. coli* isolados de útero que estão relacionados com o estabelecimento de endometrite em éguas é amplamente desconhecida. A alta variabilidade de microrganismos observados na literatura, bem como a alta resistência a antibióticos, reforçam a ideia de que tratamentos “cegos” para endometrite equina devem ser evitados. A busca de técnicas mais eficazes no diagnóstico contribui para uma melhor saúde reprodutiva das éguas e reduz as perdas financeiras para a indústria da criação de cavalos.

Dessa forma os objetivos do trabalho foi verificar a ocorrência de genes de virulência e toxicidade em isolados de *E. coli*. Comparar a frequência dos genes de virulência *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *ehxA*, *hlyA*, *iuc*, *ibeA*, *fimH*, *kpsmII* em amostras de *E. coli* isoladas do útero, de fezes e da vulva; estabelecer relação entre a presença de *E.coli*, com a sintomatologia clínica e seus fatores de virulência 24 horas após infecção experimental em éguas. Além de verificar a produção de biofilme *in vitro*, e identificação dos filogrupos patogênicos e não patogênicos das *E.coli* isoladas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As falhas reprodutivas representam uma substancial perda econômica e genética para a indústria do cavalo. A maioria dos principais problemas de infertilidade são complexos de fatores que isolados ou combinados que podem causar falhas na produção de prole. Nos últimos anos pesquisas têm sido direcionada para individualizar os mecanismos fisiopatológicos relacionados ao desempenho reprodutivo. Serão abordados nessa revisão, os principais dados relacionados a endometrite em éguas com especial foco no envolvimento de *E. coli* no processo infeccioso e inflamatório.

2.1 FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRITE

A endometrite é uma das principais causas de perdas econômicas na equideocultura. Um grande problema seria o fato de ainda ser uma patologia negligenciada e não diagnosticada e avaliada de forma coerente, utilizando os métodos de diagnósticos não tão eficazes (Rua, 2016). O qual se reflete nos dias atuais.

Infelizmente, a anatomia, assim como a fisiologia do trato reprodutivo das éguas atrasam a limpeza uterina e podem levar ao desenvolvimento de endometrite. Dessa maneira, a falha na remoção de bactérias, espermatozoides e exsudados inflamatórios, após a reprodução, muitas vezes não é diagnosticado. Defeitos na anatomia genital, nas contrações miométriais, na drenagem linfática, na depuração mucociliar, na função cervical, mais a degeneração vascular e inflamação, são susceptíveis à endometrite. (LeBlanc; Causey, 2009).

Éguas saudáveis podem limpar qualquer excesso de fluido do útero dentro de 8 horas após o coito, enquanto éguas subférteis podem reter fluido uterino por mais de dois dias após a cobertura (LeBlanc, 2003). Uma resposta inflamatória é necessária para a remoção eficaz de bactérias contaminantes e excesso de espermatozoides no útero (Woodward; Troedsson, 2015).

Dessa forma, a inflamação uterina em resposta à presença de sêmen e/ou microrganismos é uma reação fisiológica que auxilia na expulsão de debris no útero (Kotilainen *et al.*, 1994). Esta reação é imediata e ocorre através de um aporte de neutrófilos, que migram para a mucosa uterina e podem se identificados com cerca de 30 minutos após a cobertura, atingindo o pico inflamatório em aproximadamente 12 horas (Katila, 2012). Já o outro importante mecanismo para a eliminação rápida do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade miométrial, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (LeBlanc *et al.*, 1994; Troedsson *et al.*, 1993). O desempenho deste

mecanismo requer o funcionamento da cérvix (LeBlanc *et al.*, 1989).

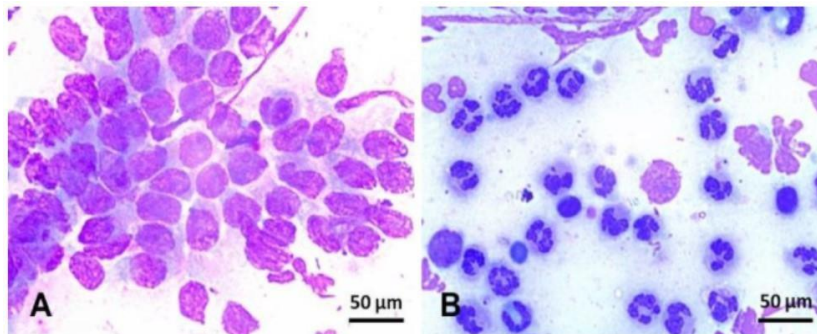
A endometrite bacteriana tem maior relevância em éguas com baixa resistência a inflamação. Os patógenos mais comuns encontrados em culturas do útero são *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Klebsiella Pneumoniae* (Woodward; Troedsson, 2015).

2.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

Um dos exames para diagnóstico para a endometrite é por raspado uterino com escova ginecológica e esfregaço em lâmina. A amostra pode ser coletada além da escova e do swab, através de lavagem uterina com solução salina (LeBlanc; Mckinnon, 2011) a qual abrange grande porção do útero, mantendo íntegras as células capturadas, entretanto, esse procedimento causa irritação moderada de endométrio (Cocchia *et al.*, 2012).

Num esfregaço corado, pode-se observar células epiteliais do endométrio e em alguns casos células de defesa, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMNs)(Fig 1). Sendo assim, a endometrite é estabelecida baseado no número de PMNs encontrados nas lâminas. Mais de um PMN cada 10 células epiteliais são consideradas como endometrite. Já Riddle (2007) ao avaliarem a citologia uterina observaram que éguas com menos de 2 PMNs por campo (x400 objetiva) apresentavam maiores taxas de prenhez (60% por ciclo) comparado com éguas com 2 a 5 PMNs por campos (x400), que apresentavam taxa de prenhez de 23%. Os mesmos autores relataram que infecções associadas com *E. coli*, eram menos prováveis de serem associadas com citologia positiva comparada com éguas infectadas com *Streptococcus zooepidemicus* (Rua *et al.*, 2016), no entanto no trabalho de Camozzato (2014), 100% das éguas positivas para *E. Coli* apresentaram citologia positiva.

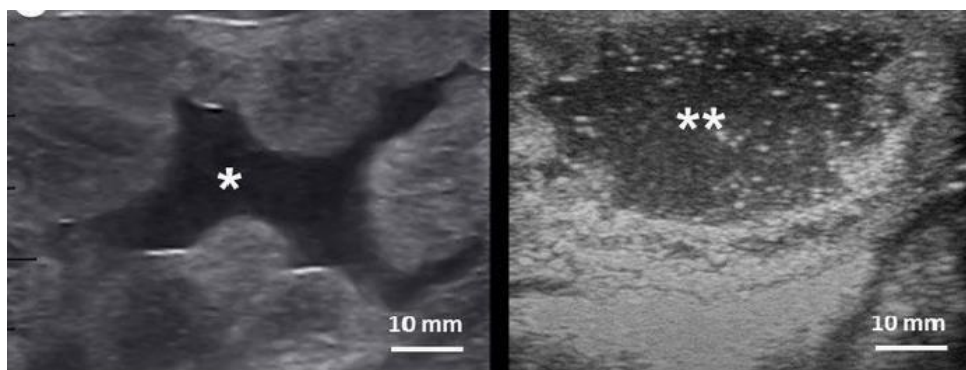
Figura 1 – Citologia endometrial em éguas coradas com coloração tipo Romanowsky ($\times 100$). (A) Citologia endometrial negativa; presença de células do epitélio do endométrio, ausência de células inflamatórias. (B) Citologia endometrial positiva; poucas células



Fonte: Canisso (2020, p. 13).

A presença de líquido na fase de diestro, também tem sido correlacionado com endometrite. Contudo, a presença de pequenas quantidades de líquido intra-uterino anecóico durante o estro é documentado mesmo na ausência de endometrite. Um pequeno volume intra-uterino anecóico líquido durante o estro (2 cm de distensão intraluminal) é frequentemente visto em éguas reprodutivamente normais. Excesso de líquido intra-uterino (fig. 2) durante o estro (>2 cm) sugere maus mecanismos de limpeza uterina e está associado a um aumento da suscetibilidade a endometrite induzida por acasalamento (Brinsko, 2011).

Figura 2 – Edema endometrial exacerbado com extravasamento e acúmulo de líquido intraluminal (*) em uma égua com endometrite e acúmulo de líquido intraluminal hiperecogênico extenso (***) em uma égua com endometrite. Barras de escala 10 mm



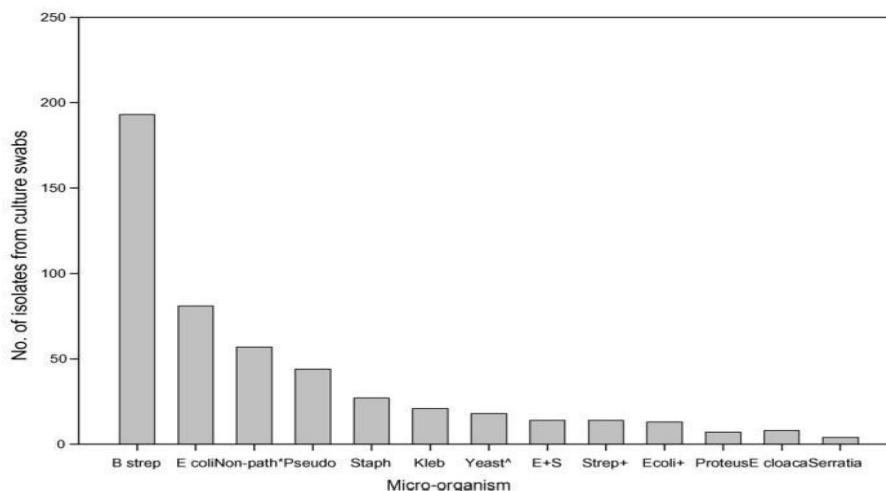
Fonte: Canisso (2020, p. 12)

A resposta inflamatória do útero equino à inseminação com sêmen fresco começa em 0,5 ou 1 h, atinge um pico entre 4 e 24 h e termina em 48 h. A grande maioria das bactérias e espermatozoides é removida dentro de 4 horas, e todas são removidas dentro de 48 horas em éguas reprodutivamente normais (Katila, 1995). Já éguas suscetíveis são incapazes de resolver a inflamação fisiológica induzida pela cobertura e inicia uma endometrite pós-cobertura persistente. A acumulação de o líquido intra-uterino persiste mais de cinco dias após a ovulação em éguas suscetíveis (LeBlanc, 2009).

A cultura bacteriana por sua vez, baseia-se na detecção do agente etiológico, porém, o seu resultado positivo não indica necessariamente a enfermidade, tendo em conta que pode haver contaminação no momento da coleta da amostra, resultando num caso de falso positivo (Troedsson, 2011). Logo, o diagnóstico definitivo de endometrite bacteriana deve ser obtido através da associação dos resultados positivos do exame microbiológico e citológico, além dos achados no exame clínico do trato reprodutivo (LeBlanc; Mckinnon, 2011). LeBlanc (2007), 498 éguas foram coletadas para isolamento de cultura bacteriana. O microrganismo mais frequentemente isolado de cultura de swabs foi *Streptococcus hemolítico* (39%) (Fig. 3), sendo a *E. coli* a segunda mais comum (16%). Juntos, os dois organismos representavam 55% de swabs de cultura positivos.

Figura 3. Prevalência de microrganismos isolados de swabs de cultura obtidos de éguas puro-sangue residentes em fazendas visitadas rotineiramente na região central Kentucky (n = 498).

*Os não-patógenos incluem *Streptococcus*, *Bacillus* e *Micrococcus*; E + S:



Fonte: LeBlac (2007, p. 407).

2.3 *ESCHERICHIA COLI*

2.3.1 Características

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodor Escherich, em 1885, que demonstrou a sua presença como hóspede natural do tubo digestivo e, devido a isso, foi inicialmente identificada por *Bacterium coli commune*. Posteriormente, em 1919, Castelani e Chalmers designaram esta bactéria por *Escherichia coli* em homenagem a Escherich (Chen; Frankel, 2005; Guerreiro, 2012).

Pertence a família *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram-negativos, medem aproximadamente de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm de comprimento (Figuras 1 e 2), móveis devido à presença de flagelos peritríquios, fermentam a glicose e a ampla variedade de outros açúcares. São oxidase-negativo, catalase-positivos, anaeróbios facultativos que não formam esporos, reduzem nitrato a nitrito, e fermentam lactose (Croxen, 2010)

Embora *E. coli* seja a bactéria anaeróbia facultativa predominante na mucosa intestinal dos mamíferos saudáveis, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro, várias cepas, ao adquirir fatores de virulência específicos, tornaram-se potencialmente danosas (Nataro; Kaper, 1998). Seis categorias distintas de cepas patogênicas intestinais de *E. coli* atualmente são reconhecidas como: enterotoxigênica (ETEC), produtora de shigatoxina/enterohemorrágica (STEC/EHEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e difusamente aderente (DAEC). Já as EXPEC (*Escherichia coli* patogênica extraintestinal) incluem infecção do trato urinário (ITU), meningite (principalmente em neonatos e após neurocirurgia), infecções intra-abdominais diversas, pneumonia (particularmente em pacientes hospitalizados), infecção intravascular, osteomielite e infecção de tecidos moles (Russo *et al.*, 2000), *sepsis-causing Pathogenic E. coli* (SEPEC): responsáveis por casos de contaminação generalizada no organismo (Bozcal, 2016); Avian Pathogenic *E. coli* (APEC): responsáveis por infecções sistêmicas em aves (Dho-Moulin; Fairbrother, 1999); Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC): associadas a infecções em glândulas mamárias de bovinos (Shpigel; Elazar; Rosenshine, 2008); Endometrial Pathogenic *E. coli* (EnPEC): associados a infecções no tecido endometrial (Sheldon *et al.*, 2010).

2.3.2 Patogênese

As cepas ExPEC são a causa de diversas infecções invasivas em humanos e animais, geralmente levando à septicemia (Mokady, 2005). Essas cepas possuem fatores de virulência específicos, como sistemas de aderências, toxinas, absorção de ferro que as distinguem das cepas comensais (Usein, 2003), assim como também, são estáveis ao calor e motilidade mediada por flagelos. As toxinas sintetizadas pelas cepas de ExPEC, representadas principalmente pela hemolisina e pelo fator necrotizante citotóxico, contribuem para a destruição das células eucarióticas. Sideróforos como a aerobactina conferem às cepas a vantagem de capturar ferro do ambiente no qual devem sobreviver e se replicar. A co-expressão de fatores de virulência contribui para a derrota do sistema de defesa do hospedeiro e o início da infecção (Usein, 2003). Embora as razões para sua evolução permaneçam misteriosas, em virtude de seus numerosos traços de virulência, ExPEC possui claramente uma capacidade única de causar doenças fora do trato intestinal do hospedeiro (Johnson, 2002).

2.3.2.1 Produção de biofilme

Muitas bactérias patogênicas e comensais são capazes de fazer a transição entre a vida no ambiente e no hospedeiro, e todas devem ser capazes de se adaptar a mudanças de disponibilidade de nutrientes, bem como às defesas imunológicas primárias (imunoglobulina predominante IgM) e secundárias (imunoglobulina predominante IgG) do hospedeiro. Um exemplo particularmente importante e clinicamente relevante de adaptação bacteriana através da expressão gênica sistematizada é a capacidade de crescer como parte de uma comunidade, referida como um biofilme. Os biofilmes estabelecidos podem tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10 a 1.000 vezes que precisavam matar bactérias planctônicas geneticamente equivalentes e extraordinariamente resistentes à fagocitose, tornando os biofilmes extremamente difíceis de erradicar dos hospedeiros vivos (Kimberly *et al.*, 2004).

A presença de material abiótico favorece bactérias para produção de biofilme, causando infecções de difícil tratamento. Por exemplo, a capacidade das bactérias de formar um biofilme sobre um cateter urinário (Naves *et al.*, 2008).

Em 1964, Ralph Mitchell e Kevin Marshall examinaram os primeiros estágios da

formação de biofilme por bactérias em culturas puras e distinguiram entre a adsorção reversível de bactérias a superfícies e a fixação irreversível subsequente que constitui o primeiro estágio de formação de biofilme (Costerton *et al.*, 1999).

O biofilme material é definido como uma comunidade de microrganismos irreversivelmente aderidos a uma superfície, produzindo substância polimérica extracelular (EPS), exibindo fenótipo alterado e apresentando resistência aumentada às respostas imunológicas inatas e antibióticos (Beehan *et al.*, 2016). Etapas para a formação de biofilme. Estágio 1: fixação inicial das células à superfície. Etapa 2: produção de EPS resultando em um acessório “irreversível” mais firmemente aderido. Etapa 3: desenvolvimento inicial da arquitetura de biofilme. Etapa 4: maturação da arquitetura do biofilme. Etapa 5: dispersão de células únicas do biofilme, de acordo com o diagrama de Stoodley (2002).

Atualmente uma série de diferentes métodos são usados, como teste em tubo, microtitulação, teste em placa, radiomarcção, microscopia, vermelho Congo, teste em placa de ágar etc. No entanto, o método da placa de microtitulação permanece entre os ensaios mais utilizados para investigação de biofilme. A coloração é um dos primeiros métodos adotados para quantificação de biomassa de biofilme (Stepanovic *et al.*, 2007).. Em poucas palavras, este método consiste na coloração de moléculas carregadas negativamente pelo corante básico cristal violeta (CV). CV vincula indiferentemente às bactérias e polissacarídeos carregados negativamente do EPS. Após a coloração, o CV adsorvido é lavado usando um solvente (por exemplo, etanol ou ácido acético). A quantidade de corante solubilizada pelo solvente (medido por absorvância óptica a 590 nm) é diretamente proporcional ao tamanho do biofilme (Pantella *et al.*, 2013).

2.3.3 Endometrite

Pouco se sabe sobre as propriedades de virulência da *E. coli* podem promover a colonização bacteriana e causar infecção sintomática na vagina. Algumas bactérias, como *Escherichia coli* aderem a superfícies epiteliais, impedindo sua remoção física (LeBlanc, 2010).

A *E. coli* está envolvida em distúrbios ovarianos iniciais e aparece aumentar a susceptibilidade do útero a subseqüentes infecções com *Arcanobacterium pyogenes* e anaeróbios gram-negativos, sendo relevante para persistência de infecção uterina, no puerpério de vacas (Miller *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008).

Como estudos demonstraram que algumas bactérias, como *Escherichia coli*, podem

utilizar lactato (presente na solução ringer lactato) (Huan, 2007) e gluconato como substratos para crescimento, uterino, a lavagem com cristaloídes, dessa forma, não pode ser usada sozinha para tratar a endometrite infecciosa (Eisenberg, 1967).

Tem sido sugerido que a *Escherichia coli* induz uma resposta inflamatória menos exsudativa e provoca uma maior lesão no tecido endometrial do que a causada por *Streptococcus zooepidemicus*. Geralmente as infecções por *E. coli* são relatadas como as mais problemáticas a resolver. Essas diferenças na resposta inflamatória podem ser devidas à indução de diferentes respostas imunes. As éguas Suceptíveis tem um exsudativo mais vigoroso em resposta a cepas genitais de *Strep zoo* do que as de *E. coli* (Eaton *et al.*, 2010). Dessa forma, as bactérias expressam diferentes fatores virulentos e têm diferentes modos de fugir da resposta imune.

2.3.4 Genes de Virulência

Existem vários genes de virulência (VG) que ajudam a *E. coli* extra-intestinal a sobreviver ao ambiente hostil do trato gastrointestinal e persistem em locais extra-intestinais para causar infecção. Estes incluem adesinas, toxinas, cápsulas de polissacarídeo e sideróforos (por exemplo, sistemas de transporte de ferro aerobactina). Muitos desses VGs são controlados por fatores genéticos que controlam sua expressão dependendo das condições ambientais, como pH, osmolaridade, temperatura e concentração de aminoácidos (Johnson, 1991; Nataro, 1998; Katouli, 2010).

2.3.4.1 *hlyA*

Três tipos de hemolisina foram identificados em *E.coli*: alfa-hemolisina (*hlyA*), entero-hemolisina (*ehxA*) . A terceira hemolisina encontrada em *E. coli* é a hemolisina E, *HlyE*, também chamada de *ClyA* ou *SheA* (Murase *et al.*, 2012, Lorenz *et al.*, 2013).

HlyA está diretamente ligada a uma disfunção intestinal, contribuindo, para a diarreia, impulsionada por um mecanismo de fluxo de vazamento e , permitindo a entrada de antígenos luminiais na submucosa, que induz inflamação e, posteriormente, ruptura da barreira epitelial. Estes efeitos foram atribuídos à sinalização de cálcio (Ca²⁺) em células epiteliais (Wiegand *et al.*, 2017). Além da lise de eritrócitos, a alfa hemolisina é tóxica para uma grande variedade de tipos celulares e contribui para indução de inflamação, e debilidade das defesas do organismo, sendo relacionada à citotoxicidade de isolados

clínicos de *E. coli* (Johnson, 1991; 2003).

Cepas que não possuem genes que promovem hemólise conseqüentemente não apresentam citotoxicidade elevada e não são capazes de suprimir citocinas, dificultando assim sua colonização no hospedeiro (Hilbert *et al.*, 2012).

As células suscetíveis do organismo têm receptores específicos que permitem a ligação da toxina alfa, causando pequenos poros resultando no vazamento de pequenos conteúdos citoplasmáticos menores que 2 kDa, como Ca^{2+} , K^{+} , alterando os gradientes de íons e, eventualmente, causando a morte da célula (Bhakdi, 1991).

2.3.4.2 Toxina Shiga

Os genes *stx*, que codificam a toxina, estão localizados no genoma do bacteriófago que se integra ao cromossomo das STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga). A presença desses genes em bacteriófagos propicia não somente a capacidade de disseminação entre diferentes cepas, como também a presença das toxinas em uma mesma bactéria. Portanto, STEC pode apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente. (Caldorin *et al.*, 2013).

Quando a STEC se adere na célula intestinal, as toxinas *stx1* e *stx2* são produzidas no intestino grosso e translocadas pelo epitélio intestinal para a circulação sanguínea. Essa toxina, quando se liga ao seu receptor, é endocitada e transportada para o complexo de Golgi e, posteriormente, para o retículo endoplasmático, bloqueando a síntese proteica, o que resulta em perda de integridade e lesão das células endoteliais vasculares pela necrose ou apoptose, cujo efeito pode ser local ou sistêmico. Essas toxinas, em contato com os rins via corrente sanguínea, causam danos ao endotélio vascular e oclusão de micro vasos, por meio de uma combinação de toxicidade direta e indução da inflamação local (Cerutti, 2018).

2.3.4.3 *ehxA*

A enterohemolisina (Ehly) é uma proteína monomérica que se insere na membrana plasmática das células eucariotas e forma poros. Ehly é codificada pelo gene *ehxA*, localizado no megaplasmídeo de 60MDa (Schmidt H *et al.*, 1999). Estudos sugerem que a enterohemolisina, ao provocar a lise de eritrócitos, promove a liberação da hemoglobina, que é utilizada como fonte de ferro para STEC, favorecendo sua multiplicação. A fertilização desses compostos resulta na multiplicação rápida do organismo. À medida que

a multiplicação ocorre, ocorre mais produção de toxinas, causando maiores danos (Law, 1995). Como a detecção da entero-hemolisina é relativamente fácil devido à sua atividade hemolítica e sua presença se correlaciona com a da toxina Shiga, ela tem sido sugerida como um marcador epidemiológico para a detecção rápida e simples de cepas STEC. (Beutin *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 2013).

2.3.4.4 *eaeA*

A adesão da bactéria está associada à expressão do gene *eae*, que induz a lesão denominada *attaching and effacing* (A/E), estas lesões são caracterizadas pela diminuição de microvilosidades e ligação bacteriana mediada por intimina à membrana plasmática da célula infectada (Frankel *et al.*, 2001).

A intimina, nome dado a molécula de adesão, pode se envolver aos receptores de membrana que ancoram os filamentos de actina polimerizados diretamente sob a bactéria aderente (Rosenheine *et al.*, 1992). A aderência pela íntima é mediada pelo produto do gene *eaeA*, a proteína Daoutermem-brana a94-k (Jerse, 1991).

2.3.4.5 *fimH*

As fímbrias tipo 1 são organelas filamentosas que cobrem a superfície da bactéria. Essas fímbrias são codificadas pelo gene *fim*, com os componentes estruturais compostos de *fimA*, *fimF*, *fimG* e *fimH*, e os pilus codificados por *fimC* e *fimD* *fimH* é a ponta do pilus que mede a ligação às glicoproteínas, estas fímbrias ligam-se a oligossacáridios que estão localizados na membrana celular das células, tais como as células epiteliais (Jones *et al.*, 1995).

As fímbrias têm papel na ativação de mastócitos no epitélio da bexiga. A ativação dos mastócitos está associada à liberação de histamina, que inicia a resposta inflamatória do organismo para eliminar a infecção. Embora a ativação dos mastócitos possa ocorrer sem contato direto com as bactérias, dados sugerem que a ativação dos mastócitos ocorre por meio do contato direto com bactérias invasoras. (Abraham, 2001). Em relação ao trato urinário, as fímbrias tipo 1 ausente de *fimH* não conseguem invadir as células da bexiga, enfatizando a importância do *fimH* para estabelecer a infecção da UTI (Wright, 2007).

O *fimH* é capaz de se ligar a diferentes tipos de células, como eritrócitos e macrófagos

(Hamrick, 2000). Essas fímbrias estimulam a adesão aos fagócitos e a fagocitose subsequente (Jonhson, 1991). Uma vez fagocitadas, as bactérias fimbriadas do tipo 1 podem sobreviver dentro dos vacúolos (Goetz, 1987). Essa capacidade ajuda as bactérias a superarem as defesas do hospedeiro e persistir para causar doenças. As fímbrias tipo 1 também são importantes para a formação de comunidades bacterianas intracelulares, que têm funções semelhantes às dos biofilmes (Katouli, 2010).

2.3.4.6 *iucD*

Aerobactina demonstra ser um fator de virulência para cepas patogênicas de *Escherichia coli* (Stehr *et al.*, 1999). *E. coli* usa ferro para transporte e armazenamento de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos. Parte da resposta à infecção é para reduzir a quantidade de ferro disponível para o patógeno invasor, diminuindo a absorção intestinal de ferro, sintetizando proteínas de ferro adicionais e transferindo o ferro do plasma para o armazenamento intracelular. Assim, as bactérias enfrentam um desafio para atender às necessidades de ferro durante a infecção. A aerobactina extrai Fe^{3+} das proteínas de ligação ao ferro do hospedeiro e é absorvida pela proteína do receptor da membrana externa. (Santos, 2018; Johnson, 1991).

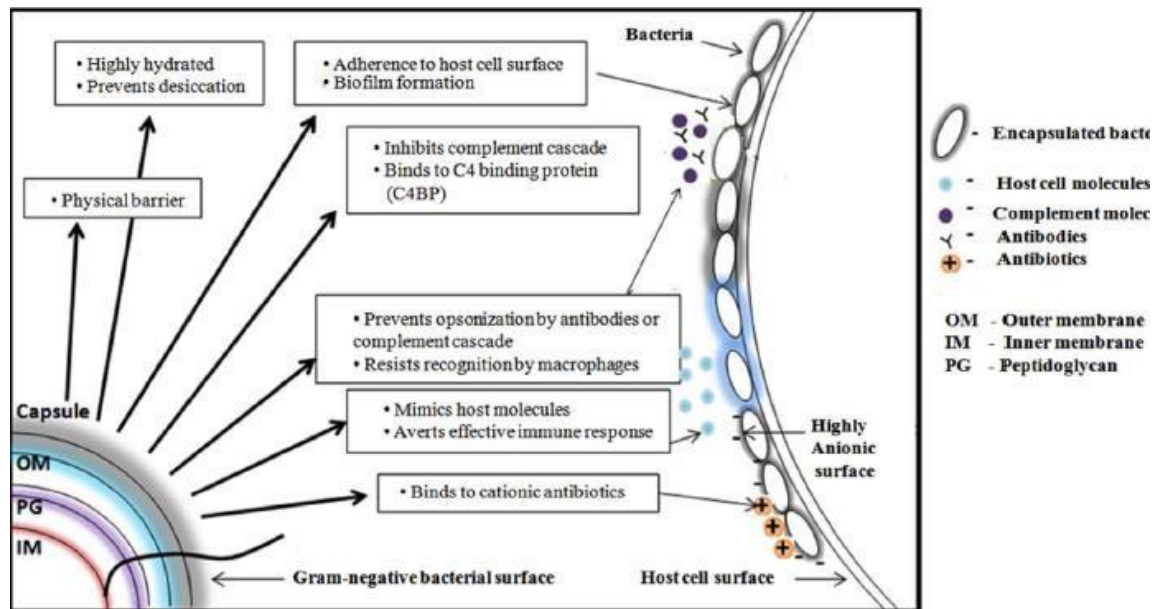
Sugere-se que operon *iuc*, codificação de aerobactina, que é envolvido na ligação do ferro, pode ser vantajoso para a sobrevivência e persistência de *E. coli* no útero. (Silva *et al.*, 2009).

2.3.4.7 *kpsM II*

kpsM é o agrupamento de genes responsável pela síntese do polissacarídeo capsular. Esse polissacarídeo, um fator de virulência essencial nessas bactérias, pode danificar o sistema imunológico do hospedeiro (Zong *et al.*, 2016). O CPS (cápsula polissacarídea) pode ser estruturalmente semelhante aos polissacarídeos da célula hospedeira e, portanto, hospedeiro pode tolerar a bactéria devido à baixa imunogenicidade. Oferece barreira física aos antibióticos, evitando a dessecação da célula bacteriana devido à natureza hidratada, facilitando a adesão da bactéria à superfície da célula hospedeira, ajudando a bactéria a escapar da resposta imune do hospedeiro por inibindo a cascata do complemento, evitando a opsonização do anticorpo, impedindo o reconhecimento por macrófagos, mimetizando moléculas do hospedeiro e inibindo a penetração de antibióticos catiônicos por ligação

a eles, representado na figura 4 (Sachdeva *et al.*, 2017).

Figura 4. Representação esquemática de várias funções do polissacarídeo capsular bacteriano Gram-negativo



Fonte: Sachdeva (2017, p.6)

Transporte de ácido polissialílico (polySia) de *Escherichia coli* é um determinante da virulência do organismo, o que lhe permite proteção às células de defesas do hospedeiro. Dois genes, *kpsM* e *kpsT* são necessários para o transporte de polySia através da membrana citoplasmática. *kpsM* é uma proteína hidrofóbica da membrana interna integral, enquanto *kpsT* é uma proteína da membrana interna periférica que se liga ao ATP (Bliss *et al.*, 1996).

2.3.4.8 *ibeA*

O gene *ibeA* (invasão do endotélio cerebral) desempenha um papel importante na

meningite neonatal em humanos, que é causada principalmente por transmissão vertical de *E. coli* (Huang *et al.*, 2001).

É possível que interação ligante-receptor pode ser facilitada pela expressão de *ibeA* em mamíferos, assim como além das células endoteliais microvasculares do cérebro, como o endométrio. Também foi relatado que o *ibeA* desempenha um papel importante na patogênese infecção extraintestinal de aves pela APEC (*Escherichia coli* Patogênica Aviária) (Bicalho *et al.*, 2010). De acordo com os estudos de Germon *et al.* (2005), o gene *ibeA* está presente no genoma de um número significativo de cepas APEC, mas ausente do genoma de cepas não patogênicas.

2.3.5 Análises filogenéticas

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extraintestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos. Essas análises filogenéticas são utilizadas em microbiologia como importante ferramenta para se conhecer a ancestralidade de um patógeno e sua relação com a patogenicidade e epidemiologia das diversas doenças. É possível identificar se um determinado conjunto de cepas isoladas pertence a uma mesma família clonal e, por consequência, se um grupo filogenético específico é mais frequente em determinados quadros infecciosos e/ou em determinadas regiões (Clermont *et al.*, 2013). Em conformidade com a nova metodologia de classificação, inicialmente as amostras são submetidas a PCR quadruplex para a amplificação dos iniciadores *chuA*, *yjaA*, *TspE4* e *arpA*.

Nas análises filogenéticas, as cepas podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie bacteriana, sendo: A, B1, B2 e D. As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, patótipos extra intestinais, porém algumas são classificadas no grupo D, isolados enteropatogênicos. Por outro lado, as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1. Contudo, alguns isolados não se classificavam nos grupos descritos e uma atualização, tornou o método mais discriminatório, de forma que as cepas de *Escherichia coli* passaram a ser distribuídas em oito filogrupos distintos: A, B1, B2, C, D, E, F e E (Clermont *et al.*, 2013) tabela 4. Com o uso desta técnica foi possível observar que cepas de ExPEC são mais comumente encontradas nos filogrupos B2, D e F e cepas diarréicas e comensais são comumente encontradas nos filogrupos A, B1, C e E. além

dos filogrupos clássicos de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2013).

Cepas extra intestinais patogênicas e comensais de *E. coli* diferem de acordo com os fatores de virulência, expressos por genes geralmente agrupados em ilhas de patogenicidade. Três marcadores de patogenicidade têm sido estudados: *chuA*, um gene necessário para o heme-transporte em *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida e um fragmento de DNA designado *TSPE4C* (Bonacorsi *et al.*, 2000). Vários estudos recentes concentraram-se na patogenicidade das FVs, mas estes estudos tiraram conclusões diferentes sobre quais FVs são fatores decisivos na determinação da patogênese (Bicalho, 2010; Bicalho, 2012; Moreno, 2020; Kassé, 2016). A inclusão de *arpA* serve a dois propósitos: Primeiro, como um controle interno de qualidade do DNA, pois, com sua adição, espera-se que todas as cepas de *E. coli* e clado I gerem pelo menos um produto de PCR usando PCR-quadruplex. Segundo a inclusão de *arpA* permite que as cepas pertencentes ao filogrupo F, anteriormente identificadas erroneamente como cepas do grupo D (*chuA* +, *yjaA* -*TspE4.C2* -), sejam distinguidas porque *arpA* está presente em todas as *E. coli*, com exceção das cepas pertencentes aos filogrupos B2 e F (Clermont *et al.*, 2013).

Figura 5. Tabela de classificação de filogrupos de acordo com a presença/ausência dos genes-

Phylogroups	Quadruplex genotypes				Next step
	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE₄.C₂</i>	
A	+	-	-	-	
B₁	+	-	-	+	
B₂	-	+	+	-	
	-	+	-	+	
	-	+	+	+	
A or C	+	-	+	-	Screen using C-specific primers (<i>TrpA</i> 219bp) If C+ then C, else A
D or E	+	+	-	-	Screen using E-specific primers (<i>arpA</i> 301bp) If E+ then E, else D
	+	+	-	+	
F	-	+	-	-	
E or Clade I	+	+	+	-	Screen using E-specific primers. If E- then clade I, Confirm using cryptic clade primers

alvo

Fonte: Moez (2020, p.3)

3 ARTIGO

Os resultados, bem como os materiais e métodos empregados para a realização do estudo que compõe esta tese, serão apresentados na forma de artigo científico para submissão na revista na *Theriogenology*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a maioria das cepas de *E. coli* estudadas pertença ao grupo filogenético de comensais, a ausência de líquido intrauterino e crescimento bacteriano nas éguas não é indicativa de uma condição saudável, devido à presença de neutrófilos no exame citológico, o que pode estar relacionado à produção de biofilme. Entre os genes estudados, o gene *fimH* não foi essencial para a produção de biofilme. A única cepa que possuía os genes *ibeA* e *KpsMTII* apresentou forte produção de biofilme.

Mais genes precisam ser analisados para identificar os fatores de virulência responsáveis por possíveis causadores de biofilme. Portanto, estudos adicionais são necessários para visualizar e determinar a função de cada fator de virulência no desenvolvimento da endometrite. A plasticidade do genoma de *E. coli* é responsável pelas diferenças relevantes observadas entre os patógenos associados a alterações endometriais em diferentes espécies. Mais pesquisas são necessárias para traduzir o conhecimento adquirido sobre os mecanismos de virulência e a adequação para o desenvolvimento de intervenções profiláticas e/ou terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. N.; SHIN J-S.; MALAVIVA, R. Type 1 fimbriated *Escherichia coli*-mast cell interactions in cystitis. **Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 183, p. s51-s55, Mar. 2001. Suppl. 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/318853>. Acesso em: 18 out. 2018.
- ALMEIDA, F. Q. A.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 119-129, July 2010. Suppl. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300014>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- BEEHAN, D. P.; PACCAMONTI, D.; Lyle S. Equine endometritis and biofilm forming *Escherichia coli*. **Pferdeheilkunde**, Baton Rouge, v. 32, p. 46-48, Jan./Fev. 2016. Disponível em: <https://pferdeheilkunde.de/files/20160108.pdf>. Acesso em: 20 jan 2020.
- BENKO, T.; BOLDIZA, M.; NOVOTNY, F.; HURA, V.; VALOCKY, I.; DUDRIKOVA, K.; KARAMANOVA, M.; PETROVIC, V. Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle. **Veterinary Medicine**, Prague, v. 60, n. 11, p. 613-620, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/8529-vetmed>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- BEUTIN, L.; ALEKSIC, S.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, Hamburg, v. 183, p. 13-21, Fev. 1994. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00193627>. Acesso em: 20 out. 2018.
- BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Reviews**, Copenhagen, v. 55, p. 733-751, Dec. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mr.55.4.733-751.1991>. Acesso em: 22 out. 2018.
- BLISS, J. M.; GARON, C. F.; SILVER, R. P. Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. **Glycobiology**, Rochester, v. 6, n. 4, p. 445-452, Jun. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/6.4.445>. Acesso em: 21 out. 2018.
- BRINSKO, S. P. *et al.* Endometritis. In: BRINSKO, S. P. *et al.* **Manual of equine reproduction**. 3rd ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011. cap. 6, p. 73-84.
- BICALHO, R. C.; MACHADO, V. S.; BICALHO, M. L.; GILBERT, R. O.; TEIXEIRA, A. G.; CAIXETA, L. S.; PEREIRA, R. V. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. **Journal Dairy Science**, Ithaca, v. 93, p. 5818-5830, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3550>. Acesso em: 18 out. 2018.
- BICALHO, M. L. S.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; GIBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, Ithaca, v. 157, p. 125-131, May 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.034>. Acesso em: 10 jul. 2023.

BONACORSI, S.; CLERMONT, O.; TINSLEY, C.; LE GALL, I.; BEAUDOIN, J.; ELION, J.; NASSIF, X.; BINGEN, E. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infectum Immunologic**, Paris, v. 68, p. 2096-2101, Apr. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.68.4.2096-2101.2000>. Acesso em: 11 jul. 2023.

BOKRANZ, W.; WANG, X; TSCHAPE, H.; ROMLING, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, Braunschweig, v. 54, p. 1171-1182, Dec. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46064-0>. Acesso em: 19 ago. 2019.

BOZCAL, E. Distribution and virulence properties of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in Turkey. **Microbiologia Medica**, Istanbul, v. 31, n. 4, Dec. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/mm.2016.6324>. Acesso em: 20 maio 2017.

CALDORIN, M. *et al.* Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Brazil and its public health importance. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 10, n. 110, p. 4- 20, fev. 2013. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicoes-2013/bepa_110.pdf. Acesso em: 20 out. 2018.

CAMOZZATO, G. C. *et al.* Endometritis in mares experimentally infected with three different strains of *E. coli*. **Pferdeheilkunde**, Porto Alegre, v. 30, p. 57-60, Jan. 2014. Disponível em: <https://pferdeheilkunde.de/files/20140109.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E Persistent breeding-induced endometritis in mares – a multifaceted challenge: from clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, Champaign v. 21, n. 4, Feb. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21041432>. Acesso em: 12 jul. 2017.

CASTILHO, L. F. F. **Endometrites na égua**: plasma autólogo acrescido de leucócitos como forma de tratamento. 1994. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

CERUTTI, M. F. **Pesquisa de *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC) em carcaças de aves comercializadas no Município de Xanxerê - SC.** 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESSEN, A. M.; PETERSEN, M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, Frederiksberg, v. 78, p. 991-1004, Set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.016>. Acesso em: 20 ago. 2017.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 29, p. 83-98, Jan. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.07.002>. Acesso em: 30 out. 2018.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E: Rapid and simple determination of the

Escherichia coli phylogenetic group. **Applied Environment Microbiology**, Paris, v. 66, p. 4555-4558, Oct. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>. Acesso em: 15 jul. 2023.

CLERMONT, O., CHRISTENSON, J. K., DENAMUR, E. & GORDON, D. M.. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo- groups. **Environ Microbiology Rep.** Paris, v. 5, p58–65, Nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>. Acesso em: 15 jul. 2023.

COCCHIA, N.; PACIELLO, O.; AULETTA, L. et al. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endo- metritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, Napoli, v.77, p.89-98, Jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.020>. Acesso em: 15 maio 2017.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bozeman, v. 11, p. 217-221, May 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7). Acesso em: 20 jul. 2018.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, Vancouver, v.8, n.1, p. 26-38, Dec. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>. Acesso em: 21 jul. 2018.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary research**, Shanghai, v. 30, n. 2–3, p. 299–316, Mar-Jun. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10367360/>. Acesso em: 10 Jul. 2017.

EATON, S.; RAZ, T.; CHIRINO-TREJO, M.; BERGERMANN, J.; CARD, C. Comparison of endometrial inflammation following intrauterine inoculation with genital strains of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* or *Escherichia coli* in the mare. **Animal Reproductions Science**, Williams Lake, p101-102, July.2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.167>. Acesso em: 10 jul. 2018.

EISENBERG, R.C.; DOBROGOSZ, W.J. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Raleigh, v.93, p.941–949, Mar. 1967. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.93.3.941-949.1967>. Acesso em: 21 mar. 2017.

FRANKEL, G., PHILLIPS, A.D, TRABULSI, L.R, KNUTTON, S., DOUGAN, G, MATTHEWS, S. Intimin and the hostcell – is it bound to end in Tir(s)? **TRENDS in Microbiology**, v.9, n 5, p. 214-218, May 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02016-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02016-9). Acesso em: 11 maio 2018.

GERMON, P.; CHEN, Y.H.; HE, L.; BLANCO, J.E.; BREE, A.; SCHOULER, C.; HUANG, S.H.; MOULIN-SCHOULEUR, M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Society**. Nouzilly, v.151, p.1179–1186, April 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27809-0>. Acesso em: 18 de ago. 2023.

GOETZ, M.B.; KURIYAMA, S.M.; SILBERBLATT, F.J.; Phagolysosome formation by polymorphonuclear neutrophilic leukocytes after ingestion of *Escherichia coli* that express type 1 pili. **Journal of the Infectious Diseases**. Chicago, v.156, p229-233, July 1987.

Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/156.1.229>. Acesso em :10 maio 2018.

GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Mammary pathogens and their relationship. **J. Dairy Sci.** v.85, p.1460–1467. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74214-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74214-8). Acesso em: 12 julho 2017. to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes

GUERREIRO, S. C. A.; **Análise molecular e fenotípica da virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de alimentos prontos-a-comer (RTE)**. 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.

HAMRICK, T.S; HARRIS, S.L; SPEARS, P.A; HAVELL, E.A; HORTON, J.R; RUSSELL, P.W,

et al. Genetic characterization of *Escherichia coli* type 1 pilus adhesin mutants and identification of a novel binding phenotype. **Journal of Bacteriology**. Raleigh, v. 182, p.4012-4021, Jul, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.182.14.4012-4021.2000>. Acesso em: 20 maio 2018.

HILBERT, D. W.; PAULISH-MILLER, T. E.; TAN, C. K.; CAREY, A. J.; ULETT, G. C.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E.; GYGAX, S. E.; TRAMA, J. P. Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin inhibit in vitro epithelial cytokine production. **Microbes and Infection**, Hamilton, v.14, n.7-8, p.628-638, Jul 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.01.010>. Acesso em: 21 maio 2018.

HUANG, S. H., WAN, Z. S., CHEN, Y. H., JONG, A. Y. & KIM, K. S. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression. **Journal of the Infectious Diseases**. Los Angeles, v.183, p.1071–1078, Apr.2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/319290>. Acesso em: 21 maio 2018.

HUGHES, J.P.; LOY, R.G. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. **Equine Veterinary Journal**. Davis, v.7, p.155-159, Jul, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1975.tb03256.x>. Acesso em: 10 jul 2017.

JERSE, A. E., and J. B. KAPER. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infection and Immunity**. Baltimore, v.59, p.4302-4309, Dec. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.59.12.4302-4309.1991>. Acesso em: 10 maio 2018.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**. Minneapolis, v. 4, p. 80-128, Jan.1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.4.1.80>. Acesso em: 14 maio 2018

JOHNSON, J.R., RUSSO, T.A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. Minneapolis v. 139, p.155-62, Mar. 2002. Disponível em: [https://www.translationalres.com/article/S0022-2143\(02\)33126-3/abstract](https://www.translationalres.com/article/S0022-2143(02)33126-3/abstract). Acesso em: 15 maio 2018.

JOHNSON, J. R. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**. Minneapolis, v. 17, p.261-272, Jan.2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00027-8). Acesso em: 15 maio 2018.

JONES, C.H.; PINKNER, J.S.; ROTH, R.; HEUSER, J.; NICHOLS, A.V.; ABRAHAM, S.N. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. St. Louis, v.92: p.2081-2085, Mar,1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.2081>. Acesso em: 10 Ago. 2018.

KATILA T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. **Reproduction in Domestic Animals** . v,47 (Supplement 5) p.31–41, 2012.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen (monograph). **Biology of Reproduction**. Hautjärvi v.1, p.515-517, Jun. 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.515. Acesso em: 20 jul. 2017.

KATILA, T . Post-mating inflammatory responses of the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**. Saarentaus, v. 47 (Supplement 5) p.31–41, Aug.2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02120.x>. Acesso em: 21 jul. 2017.

KASSÉ, F. N., FAIRBROTHER, J. M. and DUBUC, J. Relationship between Escherichia coli virulence factors and postpartum metritis in dairy cows. **Journal Dairy Science**. St-Hyacinthe v.99, p 4656–4667, Jun.2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10094>. Acesso em: 22 jul. 2023.

KATOULI, Mohammad. Population structure of gut Escherichia coli and its role in development of extra-intestinal infections. **Iranian journal of microbiology**, Queensland v. 2, n. 2, p. 59, Jun 2010. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3279776/pdf/IJM-2-059.pdf>. Acesso em: 16 maio 2018.

KIMBERL, Y. K ; JEFFERSON, What drives bacteria to produce a biofilm?, **FEMS Microbiology Letters**, Volume 236, n. 2, P.163-173, July 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x> . Acesso em: 2 jul. 2019

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, Salford v.41, p.629-636, Feb, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90173-G](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90173-G). Acesso em: 25 maio 2018.

LAW, D.; KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by Escherichia coli O157 and other Shiga like toxin producing E. coli serogroups. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, p. 700-702, Feb,1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.63.2.700-702.1995>. Acesso em: 4 jul. 2019.

LeBLANC, M.M.; ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **American Journal Veterinary**, Gainesville v. 50, p. 864-867, Jun 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2669573/>. Acesso em: 25 maio 2018.

LeBLANC, M.M; NEUWIRTH, L; MAURAGIS, D, KLAPSTEIN,E; TRAN, T. Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Equine Veterinary Journal**. Gainesville v. 26, n. 4, p. 279-282, Jul 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04387.x>. Acesso em: 25 maio 2018.

LeBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis. *In*: ROBINSON, N. E. (ed.) **Current therapy in equine medicine**. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003. p. 234-237.

LeBLANC, M. M. *et al*; Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**. Gainesville v. 68. p. 403–412, Aug 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.038>. Acesso em:25 maio 2018.

LeBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. Gainesville V. 44, Issue 3, p10-22, Jul.2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x>. Acesso em: 26 maio 2018.

LeBLANC, M.M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post–Mat- ing-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in Domestic Animals**, 45 (Suppl. 2), 21– 27, May.2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x>. Acesso em:26 maio 2018.

LEBLANC, M.M.; McKINNON, A.O. Breeding the Problem Mare. *In*. MCKINNON A.O.; SQUIRES E.L.; VAALA W.E.; VARNER D.D. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. cap. 272, p. 2620-2642.

LINDSTEDT, B.A.; FINTON, M.D.; PORCELLATO, D.; BRANDAL, L.T. High frequency of hybrid Escherichia coli strains with combined Intestinal Pathogenic Escherichia coli (IPEC) and Ex- traintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. **BMC Infectious Diseases**. N-1432 Ås, v.18, (Published: 01) 544, Nov.2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3449-2>. Acesso em: 10 maio 2019.

LORENZ, S.R; SON, I; MAOUNOUNEN-LAASRI, A; LIN, A; FISCHER, M; KASE, J.A. Prevalence of Hemolysin Genes and Comparison of ehxA Subtype Patterns in Shiga Toxin-Producing Esch- erichia coli (STEC) and NonSTEC Strains from Clinical, Food, and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**. Hamburg v. 79, n. 20, p. 6301–6311.Oct 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3811216/pdf/zam6301.pdf>. Acesso em:11 maio 2019.

MILLER, A. N. A., WILLIAMS, E.J.; SIBLEY, K.; HERATH, S.; LANE, E. A.; FISHWICK, J.; NASH, D. M.; RYCROFT, A. N.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Sheldon. The effects of Arcanobacterium pyogenes on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. **Theriogenology** London, v.68, p. 972–980, Oct.2007. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3811216/pdf/zam6301.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2017.

MOEZ, N.M, MASHOUF, R.Y, IRAJ SEDIGHI, I, LEILI SHOKOOHIZADEH, L,

MOHAMMAD. Phylogroup classification and investigation the relationships between phylogroups and antibiotic resistance patterns of uropathogenic *E. coli* isolated from pediatric urinary tract infection. **Gene Reports**. Hamadan, v.20, p.100758 Sept, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100758>. Acesso em: 10 ago. 2023.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains.

International Journal of Medical Microbiology, Tel-Aviv. v. 295, n. 6–7, p.455-62, Oct,2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.007>. Acesso em: 21 mar. 2017.

MORENO, G.C.; LUQUE, T.A.; OLISZEWSKI, R., ROSA, R. J.; OTERO, M. C. Characterization

of native *Escherichia coli* populations from bovine vagina of healthy heifers and cows with postpartum uterine disease, **PLoS One**, Tucumán v. 15, n. 6, Jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228294>. Acesso em: 11 ago. 2023.

MURASE, K.; OOKA, T.; IGUCHI A.; OGURA, Y.; NAKAYAMA, K.; ASADULGHANI, M.; ISLAM, M.R.; HIYOSHI, H.; KODAMA, T.; BEUTIN, L.; HAYASHI, T. Haemo-lysin

E-and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157strains and other *Escherichia coli* lineages. **Microbiology**. Miyazaki, v.158, p.746 –758, Mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.054775-0>. Acesso em: 10 maio 2019.

McKINNON, A. O.; BEHANN, D.P. Use of chromogenic agar to diagnose reproductive pathogens. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (ed.). **Equine Reproduction**. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell: 2011. v. 2, p. 1979-1987.

NATARO, J. P.; KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>. Acesso em: 11 maio 2019.

NAVES, P.; Del PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; RODRIGUEZ- CERRATO, V.; PONTE, M.C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**. Madrid, v. 45, p. 86–91, Aug.2008. Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.03.003>. Acesso em: 20 maio 2019.

NUNES, K. O. **Relações filogenéticas entre *Escherichia coli* enteroagregativa e uropatogênica**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Acesso em: 11 ago. 2023.

RICKETTS, S.W.; MACINTOSH, M.E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Newmarket, Supplement v.35, p.343-351, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3479588/>. Acesso em: 5 mar 2017.

RIDDLE, W.T.; LeBLANC, M.M & STROMBERG, A.J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**. Lexington, v. 68, p.395–402, Aug. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.050>. Acesso em: 10 jul. 2017.

ROCHA, S.L.S; **Deteção de fatores de virulência de amostras de *escherichia coli***

isoladas de granjas avícolas do rs através do Multiplex-pcr, 2008, 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/12705>. Acesso em: 21 maio 2019.

ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. **EMBO Journal**. Vancouver, v.11 n.10, p3551 -3560, Oct 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05438.x>. Acesso em: 5 mar. 2017.

RUA, M.A.S.; QUIRINO, C.R.; JUNIOR, A.B.; BARRETO, M.A.P.; Métodos diagnósticos de endometrite em éguas. **Pubvet**. Campos dos Goytacazes, v10, n12, p.895 -908, Dez.2016. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v10n12.895-908>. Acesso em: 6 mar. 2017.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**. Buffalo, v. 181, n. 5, p.1753-4. May 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/315418>. Acesso em: 6 mar. 2017.

SACHDEVA, S.; PALUR, R.V.; SUDHAKAR, K.U.; RATHINAVELAN, T.; E. coli Group 1 Capsular Polysaccharide Exportation Nanomachinery as a Plausible Antivirulence Target in the Perspective of Emerging Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**. Nisshin, v. 8, p.70., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00070>. Acesso em: 25 maio 2018.

SANTOS, T.G. **Patotipagem, tipagem filogenética, determinação de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* uropatogênica**. 2018, 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P.I.; FROSCHE, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence of clonality. **Journal of Infectious Diseases**. Würzburg, v. 179, p115-123, Jan 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/314537>. Acesso em: 10 jul. 2019.

SHELDON, I. M., RYCROFT, A. N., DOGAN, B., CRAVEN, M., BROMFIELD, J. J., CHANDLER, A., ROBERTS, M. H., PRICE, S. B., GILBERT, R. O., & SIMPSON, K. W. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. Swansea, **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9192, 12 fev. 2010. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0009192. Acesso em: 16 maio 2017.

SHPIGEL, N. Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, Rehovot, v. 11, n. 1, p. 60–65, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.004>. Acesso em: 15 maio 2017.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; TENREIRO, T.; POMBA, C.; NUNES, T.; Da COTAS, L.L., et al. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus

of puerperal dairy cows. **Journal Dairy Science**. Lisbon, v. 92, n. 12, p. 6000–10, Dec 2009. Disponível em: <https://www.journalofdairyscience.org/action/showPdf?pii=S0022-0302%2809%2971317-7>. Acesso em: 10 de maio de 2015.

STEHR, M., SMAU, L.; SINGH, M.; SETH, O.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; DIEKMANN, H. Studies with Lysine N6 -Hydroxylase. Effect of a Mutation in the Assumed FAD Binding Site on Coenzyme Affinities and on Lysine Hydroxylating Activity. **Biological Chemistry**, v. 380, p. 47 – 54, Jan 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/BC.1999.006>. Acesso em: 10 jul. 2018.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; Di BONAVENTURA, G.; DJUKĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F.; Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**. v.115, n.8. p.891-9, Aug 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x. Acesso em: 10 mar. 2019.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**. Bozeman, v. 56, p. 187-209, Octo. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>. Acesso em: 11 mar. 2019.

TROEDSSON, M. H. T. Endometritis. In:McKINNON, A. O., SQUIRES, E. L., VAALA, W. E., VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. cap.271, p. 2608-19, 2011. 10 mar. 2019.

USEIN, C.R.; DAMIAN, M. Uropathogenic *Escherichia coli*-ExPEC pathotype, the best characterized. **Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol**. Bucharest, v.48, p.31-6, Jan.2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00164.x>. Acesso em: 26 out. 2018.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.An update on uterine defense mechanisms in the mare, **Journal of Equine Veterinary Science**. v.10, n.3, p.169-175, May-Jun. 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(06\)80154-1](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(06)80154-1). Acesso em: 21 maio 2017.

WELCH, R. A. Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. **Microbiol Spectr**. v.4, n.3, Jun.2016, Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0011-2012>. Acesso em: 27 out. 2018.

WIEGAND, S., ZAKRZEWSKI, S., EICHNER, M. *et al.* Zinc treatment is efficient against *Escherichia coli* α -haemolysin-induced intestinal leakage in mice. **Sci Rep**. V. 7, n, 45649, Marc. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep45649>. Acesso em:01 nov 2024.

WILLIAMS, E. J., K. SIBLEY, A. N.; MILLER, E. A.; LANE, J.; FISCHWICK, D. M.; NASH,S.;HERATH, G. C.; ENGLAND, H; DOBSON, and I. M. SHELDON. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. **American Journal of Reproductive Immunology**. Belfield, v.60, p. 462–473, Nov.2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00645.x>. Acesso em: 20 de mar. de

2017.

WOODWARD, E.M. & TROEDSSON, M.H.T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, Kennett Square, v.47, p.384–389, Jul.2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/evj.12403>. Acesso em: 20 maio 2017.

WRIGHT, K.J.; SEED, P.C.; HULTGREN, S.J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cellular Microbiology**. St. Louis, v.9, p2230–2241, Jul 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x>. Acesso em:27 out .2018.

YAMAMURA, F.; SUGIURA, T.; MUNBY, M.; SHIOKURA, Y.; MURATA, R.; NAKAMURA, T.; FUJIKI, J.; IWANO, H. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors, notably kpsMTII, and symptoms of clinical metritis and endometritis in dairy cows. **Journal Veterinary Medicine Science**. Hokkaido, v. 84. p. 20-428, Mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0586>. Acesso em: 26 out. 2018.

ZONG, B; LIU, W; ZHANG, Y; WANG, X; CHEN, H; TAN, C. Effect of kpsM on the virulence of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. Wuhan, v. 363, n.21, Nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw232>. Acesso em: 25 out. 2018.