



INFORME BREVE

Caracterización de cepas patógenas extraintestinales de *Escherichia coli* aisladas de perros y gatos de compañía de Buenos Aires, Argentina



Cecilia C. Cundon*, Alejandro Ameal, Elsa Maubecín y Adriana Bentancor

Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 19 de octubre de 2016; aceptado el 9 de noviembre de 2017

Disponible en Internet el 15 de marzo de 2018

PALABRAS CLAVE

ExPEC;
Filogrupos;
Factores de
virulencia;
Animales de
compañía

KEYWORDS

ExPEC;
Phylogroup;
Virulence factors;
Companion animals

Resumen El pangenoma de *Escherichia coli* se compone de un core conservado y regiones genómicas variables. El componente genético constante permite determinar la filogenia del microorganismo, mientras que la variabilidad genética ha permitido el surgimiento de cepas patógenas intestinales y extraintestinales. En este estudio caracterizamos genéticamente 85 cepas patógenas extraintestinales aisladas de caninos y felinos. Se utilizó el esquema de Clermont para agruparlas en relación con el filogrupos de pertenencia (intestinal: A y B1; extraintestinal: B2 y D) y se investigó en ellas la presencia de varios marcadores de virulencia (*pap1-2*, *pap3-4*, *sfa*, *afa*, *hlyA*, *aer* y *cnf*), así como de marcadores de patovares híbridos. El 69,4% de los aislamientos pertenecieron al filogrupos A; el 1,2% al B1; el 16,5% al B2 y el 12,9% al D. El gen encontrado con mayor frecuencia fue *sfa* (21/85), seguido de los genes *pap1-2* y *cnf* (20/85) y *pap3-4* (19/85). No se detectaron híbridos. Los aislamientos en animales deben ser estudiados debido al potencial zoonótico del microorganismo.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from household dogs and cats in Buenos Aires, Argentina

Abstract The pangenome of *Escherichia coli* is composed of a conserved core and variable genomic regions. The constant genetic component allows to determine the phylogeny of the microorganism, while genetic variability promoted the emergence of intestinal pathogenic strains and extraintestinal strains. In this study we characterized 85 extraintestinal pathogenic isolates genetically isolated from canines and felines. We used the Clermont scheme that

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ccundon@fvet.uba.ar (C.C. Cundon).

includes intestinal (A and B1) and extraintestinal (B2 and D) phylogroups, virulence markers (*pap1-2*, *pap3-4*, *sfa*, *afa*, *hlyA*, *aer* and *cnf*) and hybrid pathogens. A percentage of 69.4% of the isolates belonged to phylogroup A; 1.2% to phylogroup B1; 16.5% to phylogroup B2 and 12.9% to phylogroup D. The most commonly found gene was *sfa* (21/85), followed by *pap1-2* and *cnf* (20/85) and *pap3-4* (19/85). No hybrids were detected. Animal isolates should be studied due to the zoonotic potential of the microorganism.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Escherichia coli es un miembro de la microbiota del intestino grueso de los mamíferos. La posibilidad de adquirir elementos genéticos por transferencia horizontal dio lugar al surgimiento de cepas patógenas, que han sido categorizadas como intestinales o extraintestinales y que son responsables de diferentes cuadros clínicos⁷. En este último grupo, las cepas uropatógenas (UPEC) son responsables de infecciones urinarias tanto en el hombre como en animales y se asocian a distintas enfermedades urogenitales, como cistitis, nefritis y prostatitis¹³. La habilidad de este patógeno de colonizar el tracto urinario y producir infecciones se debe potencialmente, al menos en parte, a la versatilidad del genoma de UPEC, que remodela su repertorio genético a través de la adquisición y pérdida de atributos de virulencia¹². Esta plasticidad en su genoma hace que la diferencia entre aislamientos patógenos y comensales se base en sus antecedentes filogenéticos⁹.

Los factores de virulencia de cepas UPEC incluyen adhesinas fimbriales, adhesinas afimbriales, toxinas y sideróforos, entre otros¹³. Estos atributos de virulencia facilitan la habilidad de las cepas UPEC de colonizar el tracto urinario y ejercer su efecto citopático. Entre ellos se destacan las adhesinas fimbriales, como las fimbrias P (*pap*: pili asociado a pielonefritis); las fimbrias S, codificadas por el gen *sfa*; y dentro del grupo de las adhesinas afimbriales, la proteína AFA. Entre las toxinas se pueden mencionar el factor citotóxico necrosante (*cnf*) y una hemolisina (*hlyA*). La captación de hierro favorece la supervivencia en el tracto urinario. El microorganismo sintetiza 4 tipos de sideróforos, entre ellos la hidroxamato-aerobactina (*aer*)⁵.

El esquema de Clermont clasifica las cepas de *E. coli* en 2 grandes grupos: extraintestinales (filogrupos B2 y D) e intestinales (filogrupos B1 y A)². La determinación del filogrupo se basa en la presencia/ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2. La mayoría de las UPEC pueden ser clasificadas en los filogrupos B2 o D. Además, las cepas pertenecientes al filogrupo B2 con capacidad de descarboxilar lisina y ornitina son posibles productoras de meningitis neonatal en el humano.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de factores de virulencia propios de cepas uropatógenas en aislamientos de *E. coli* provenientes de muestras clínicas de caninos y felinos atendidos en el Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, y establecer la correlación entre la presencia de

dichos factores y el filogrupo al cual pertenecen los aislamientos.

Aislamientos: se incluyeron 85 aislamientos clínicos de *E. coli* obtenidos en el período 2006-2012 en el laboratorio del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias. En lo que respecta al origen, 69 fueron obtenidos de caninos (44 hembras, 25 machos) y 15 de felinos (5 hembras, 10 machos). De una muestra no se obtuvieron los datos de la especie. Los materiales clínicos de los que provenían los aislamientos incluyeron 73 muestras de cistitis, 8 de peritonitis y una de cada uno de los siguientes materiales: líquido de prostatitis, fístula paraanal, herida y hernia perineal fistulizada.

Se corroboró que los aislamientos pertenecieran a la especie *E. coli* mediante pruebas de bacteriología clásica, que incluyeron oxidasa, catalasa, oxidación-fermentación de la glucosa, reducción de nitratos a nitritos, fermentación de lactosa, producción de indol, vía de fermentación de la glucosa (rojo de metilo o Voges-Proskauer) y uso de citrato como fuente de carbono⁶. Posteriormente, se llevó a cabo la tipificación molecular de los aislamientos mediante la identificación del gen que codifica la enzima β D-glucuronidasa (*uidA*)⁸. Para la obtención de los templados, a partir del cultivo en pureza en agar tripteína soja se tomó una unidad formadora de colonia y se suspendió en 150 μ l de agua bidestilada estéril. Se hirvió al baño María durante 10 min. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y se utilizó el sobrenadante como templado de PCR.

Agrupación en filogrupos: mediante reacción múltiple de PCR se amplificaron los 3 genes que se utilizan para la agrupación en filogrupos. Los pasos de PCR fueron los siguientes: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, 30 ciclos (94 °C 5 s, 59 °C 10 s, 72 °C 30 s) y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los resultados se interpretaron de acuerdo con el esquema de Clermont et al.², considerando la presencia (+) o ausencia (–) de los 3 genes en estudio (*chuA*, TspE4.C2 y *yjaA*) de la siguiente manera: filogrupo A, *chuA* (–) y TspE4.C2 (–); filogrupo B1, *chuA* (–) y TspE4.C2 (+); filogrupo B2, *chuA* (+) y *yjaA* (+), y filogrupo D, *chuA* (+) y *yjaA* (–).

PCR de genes de virulencia: se amplificaron 7 genes considerados marcadores de virulencia de las cepas UPEC¹⁵. Los pasos de PCR para todos los genes fueron los siguientes: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 30 ciclos (94 °C 1 s, 63 °C 30 s, 72 °C 3 min) y una extensión final

Tabla 1 Distribución en filogrupos y presencia de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* extraintestinales aisladas de distintas muestras clínicas de caninos y felinos de compañía

Muestra	Especie	Filogrupo	<i>pap1-2</i>	<i>pap3-4</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf</i>
Orina	Caninos 59	A = 39	6	3	7	1	4	5
		B2 = 11	3	4	6	0	0	6
		D = 9	3	3	2	1	0	3
	Felinos 13	A = 10	4	5	3	0	2	4
		B1 = 1	0	0	0	0	0	0
		B2 = 2	1	1	1	0	0	1
Cavidad abdominal	Caninos 6	A	0	0	0	0	0	0
		D = 1	1	1	1	0	0	1
	Felinos 2	A = 1	1	0	0	0	1	0
		B2 = 1	0	1	0	0	0	0
Líquido prostático	Canino 1	A	0	0	0	0	0	0
Hernia perineal	Canino 1	A	0	0	0	0	0	0
Fístula paraanal	Canino 1	A	0	0	0	0	0	0
Herida	S/D 1	A	0	0	0	0	0	0

S/D: sin datos.

a 72 °C durante 7 min. Se evaluó la presencia de patovares híbridos mediante el estudio de los marcadores de 6 genes correspondientes a los patovares intestinales: *E. coli* enteropatógena (*eae*), *E. coli* enterotoxigénica (*elt*, *est*), *E. coli* enteroinvasiva (*invE*), *E. coli* productora de toxina Shiga (*stx1*, *stx2*), *E. coli* enteroagregativa (*aggR*, *aaic*) y *E. coli* de adherencia difusa (*daaD*). Las secuencias de cebadores de todas las reacciones de PCR se incluyen en el [material suplementario](#)⁴.

Descarboxilación de lisina y ornitina: se estudió la habilidad de descarboxilar la lisina y la ornitina en todas las cepas pertenecientes al filogrupo B2. Para ello, a partir de un cultivo en pureza se realizó una suspensión en solución salina correspondiente al tubo 4 del nefelómetro de McFarland y se adicionó un disco de reactivo (DiatabsTM, Rosco Diagnostica, Washington, EE. UU.), se agregaron al tubo 3 gotas de parafina y se incubó a 37 °C durante 24 h.

Análisis estadístico: se utilizó el test exacto de Fisher para comparar asociaciones entre grupos filogenéticos y factores de virulencia ($p < 0,01$). A su vez, mediante el test de Wilcoxon se evaluó la distribución de perfiles de virulencia (0 a 4 factores de virulencia) en los filogrupos intestinales (A + B1) vs. extraintestinales (B2 + D), considerando el mismo valor p .

La distribución de factores de virulencia por filogrupo en relación con el material clínico de origen se observa en la [tabla 1](#). De los aislamientos obtenidos de orina, el 68,5% perteneció al filogrupo A, el 17,8% al B2, el 12,3% al D y el 1,4% al B1. De los aislamientos que se obtuvieron de cavidad abdominal, el 75% perteneció al filogrupo A, el 12,5% al D y el 12,5% restante al B2. Se observó una distribución diferencial de los factores de virulencia entre los filogrupos intestinales vs. los extraintestinales. El filogrupo A presentó la mayor frecuencia de factores

de virulencia relacionados con la uropatogenicidad, seguido del filogrupo B2 y, finalmente, del D. El único aislamiento perteneciente al filogrupo B1 que se identificó en esta investigación no presentó ningún gen vinculado con los factores de virulencia en estudio. Los aislamientos recuperados de fuentes diferentes de orina o cavidad abdominal pertenecieron al filogrupo A y no codificaron factores de virulencia. Se determinó asociación estadísticamente significativa entre los filogrupos intestinales y la presencia de factores de virulencia.

La distribución de los perfiles de virulencia de acuerdo con el filogrupo se observa en la [tabla 2](#). El perfil de virulencia que se presentó con mayor frecuencia fue *pap1-2/pap3-4/sfa/cnf*. Este perfil fue observado en 10 aislamientos, 4 de los cuales pertenecían al filogrupo B2, 3 al D y 3 al A, mientras que 46 aislamientos no codificaron ningún factor de virulencia y la mayor proporción de estos pertenecieron al filogrupo A. Teniendo en cuenta la división entre filogrupo B2 (de importancia en salud pública por su potencial producción de meningitis neonatal) y filogrupos no B2, el test de Wilcoxon demostró que el filogrupo B2 con 4 marcadores de virulencia presentó una asociación estadísticamente significativa (valor de virulencia de la mediana de 1 vs. 0; $p < 0,01$).

Los 14 aislamientos que pertenecían al filogrupo B2 fueron positivos a las pruebas de lisina y ornitina descarboxilasa.

De acuerdo con lo postulado por Chew et al.¹, la mayoría de los aislamientos analizados en el período 2006-2012 correspondieron a infecciones del tracto urinario en los caninos (59/85), los que presentan este tipo de infección con más frecuencia que los felinos.

Con respecto a los grupos filogenéticos, la mayoría de los aislamientos pertenecieron al grupo intestinal, y dentro

Tabla 2 Distribución de perfiles de virulencia de aislamientos de *Escherichia coli* extraintestinales recuperados de muestras clínicas de caninos y felinos de compañía, categorizados por filogrupo

N.º de factores	N.º de aislamientos	Frecuencia (%)	Filogrupo	Perfil de virulencia	N.º de aislamientos	Frecuencia (%)
0	45	52,9	A		33	73,34
			B1		1	2,2
			B2		6	13,33
			D		5	11,11
1	15	17,8	A	<i>pap</i> 1-2	3	20
				<i>pap</i> 3-4	1	6,66
				<i>sfa</i>	2	13,33
				<i>afa</i>	1	6,66
				<i>aer</i>	6	40
				<i>pap</i> 3-4	1	6,66
2	10	11,8	A	<i>afa</i>	1	6,66
				<i>pap</i> 1-2, <i>aer</i>	1	10
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4	2	20
				<i>pap</i> 3-4, <i>cnf</i>	1	10
				<i>sfa</i> , <i>aer</i>	1	10
				<i>sfa</i> , <i>cnf</i>	3	30
3	5	5,8	A	<i>sfa</i> , <i>cnf</i>	2	20
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>cnf</i>	2	40
				<i>pap</i> 3-4, <i>sfa</i> , <i>cnf</i>	1	20
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>cnf</i>	1	20
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>sfa</i>	1	20
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>sfa</i> , <i>cnf</i>	3	30
4	10	11,8	B2	<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>sfa</i> , <i>cnf</i>	4	40
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>sfa</i> , <i>cnf</i>	3	30
				<i>pap</i> 1-2, <i>pap</i> 3-4, <i>sfa</i> , <i>cnf</i>	3	30

de este, al filogrupo A; solo uno de ellos perteneció al filogrupo B1. Esto podría deberse a que *E. coli* comensal puede comportarse como un patógeno oportunista. La presencia de aislamientos procedentes de muestras de orina pertenecientes al filogrupo A concuerda con los resultados obtenidos por Millán et al.¹⁰; sin embargo, estos autores no tuvieron aislamientos pertenecientes al filogrupo B1. Por otro lado, otros autores informaron la recuperación exclusiva de aislamientos pertenecientes a filogrupos extraintestinales¹⁴, o una recuperación predominante de aislamientos asociados al filogrupo B2¹⁴. Asimismo, se ha documentado el aislamiento de cepas UPEC clasificadas en los 4 filogrupos¹¹, tal como fue observado en nuestra colección de aislamientos, pero con un predominio de los grupos filogenéticos extraintestinales.

La transferencia horizontal de genes y el intercambio genético en las cepas UPEC ya han sido descriptos previamente⁹. Esto podría explicar la presencia de genes asociados a la uropatogenicidad en las cepas de origen intestinal halladas en este estudio. Dadas las características anatómicas, es esperable que se aislen *E. coli* intestinales en cistitis en las hembras, no así en los machos. Dado que los hábitos de lamido pueden estar implicados en la adquisición de la infección, esto representa una alarma en términos de salud pública.

La asociación observada en la distribución de los factores de virulencia de los aislamientos pertenecientes al filogrupo B2 respecto a aquellos no B2 coincide con la hallada por Tramuta et al.¹⁴. Por lo tanto, y pese a que el UPEC es descrito como un patovar heterogéneo, tanto en este estudio como

en el citado se observó que los aislamientos no relacionados presentan una asociación estadística semejante en la distribución de sus factores¹⁴.

Las adhesinas fimbriales han sido destacadas como marcadores de la patogenicidad de las cepas¹³. Por consiguiente, la alta frecuencia de fimbrias P y S en los aislamientos estudiados del filogrupo B2 permite suponer la circulación de cepas con alto poder patogénico. La asociación a dichos factores del factor citotóxico necrosante ha sido señalada, a su vez, como un indicador del incremento en la virulencia de la cepa¹³. Por otro lado, y en coincidencia con lo ya reportado, pocas cepas presentaron determinantes de adhesinas afimbriales, como *afa*¹³.

Si bien en esta investigación ninguna de las cepas bajo estudio presentó el gen *hly*, otros autores hallaron este gen en cepas UPEC en porcentajes variables, de hasta el 27%^{11,12,14}. Al igual que en esta investigación, en esos estudios se encontró una alta prevalencia del gen *sfa* (53%), pero una menor proporción de *pap* (13%)¹².

Es importante destacar que en 3 aislamientos observamos ambas fimbrias (*sfa* y *pap*) asociadas, y en uno de ellos, adicionalmente, detectamos el gen *cnf*. El análisis de estos marcadores y la frecuencia de *pap* indicarían un potencial patógeno asociado a pielonefritis entre las cepas circulantes en Buenos Aires. Respecto del potencial de virulencia relacionado con la presencia de sideróforos, detectamos que el 13,6% de las cepas del filogrupo A portaban *aer*, mientras que en los otros filogrupos este gen no estaba presente. Esto se opone a los resultados de Munkhdelger et al.¹¹, quienes observaron *aer* en todos los filogrupos

(56,1%), con una mayor frecuencia en B2¹¹. En dicho estudio, la alta proporción de *aer* se asoció con proporciones de *afa* y de *sfa* menores del 20% (15,5 y 8,8%, respectivamente). Las adhesinas fimbriales y el factor citotóxico necrosante han sido encontrados en aislamientos procedentes tanto de humanos como de animales, lo que evidencia el potencial zoonótico de *E. coli*³. Clermont et al.³ han señalado que las cepas patógenas humanas y animales comparten antecedentes genéticos comunes; sin embargo, considerando cepas no B2 de diversos orígenes, diferentes conjuntos de adhesinas podrían estar implicadas en la especificidad del huésped².

En conclusión, la evolución genética de *E. coli* de cepas comensales a cepas patógenas permitió el surgimiento de cepas UPEC, las cuales conforman un grupo heterogéneo dentro de una amplia clasificación de patógenos extraintestinales. La adquisición de elementos genéticos por transferencia horizontal permite a este patógeno causar cuadros clínicos urogenitales de distinta gravedad. Las adhesinas (fimbriales y afimbriales) posibilitan la contaminación del perineo y contribuyen a causar infecciones urinarias ascendentes. Algunos factores de virulencia adicionales, como invasinas y toxinas, permiten la diseminación al torrente sanguíneo y causan cuadros de bacteriemia.

Los filogrupos extraintestinales presentaron una virulencia mayor que los intestinales, si bien los genes son putativos. Dentro de los primeros, el filogrupo B2 fue el que reunió los aislamientos con mayor cantidad de factores de virulencia y el que incluyó, adicionalmente, cepas con potencial de producción de meningitis neonatal. Estos aislamientos circulan en la población animal de compañía en la ciudad de Buenos Aires.

La monitorización de las cepas patógenas en caninos y felinos y su caracterización son de importancia por su potencial zoonótico³ en relación con el estrecho contacto hombre-animal de compañía en las ciudades, donde la interfase entre ambos en la cadena epidemiológica debe ser evaluada.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires, UBACyT 20020110100149 y 20720150200009BA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló con la colaboración del Doctor Osvaldo Degregorio, quien realizó invaluable aportes en el análisis estadístico de los datos.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.003).

Bibliografía

1. Chew DJ, DiBartola SP, Schenck PA. Cystitis and urethritis: Urinary tract infection. En: Canine and feline nephrology and urology. 2nd ed St. Louis: Elsevier Saunders; 2011. p. 240–71.
2. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Environ Microbiol*. 2000;13:2468–77.
3. Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, Glodt J, Picard B, Oswald E, Denamur E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol*. 2011;11:654–62.
4. Cundon C, Marey E, Roldán F, Canosa Montero CS, Navarro Ocaña A, Padola NL, Gadea P, Blanco Crivelli X, Babich J, Rocchi D, Kiernicki MC, Binotti S, Calzetta Resio A, Bentancor A. Detección y caracterización preliminar de *Escherichia coli* O174 productor de toxina. *SNS*. 2015;8:52–63.
5. Gao Q, Zhang D, Ye Z, Zhu X, Yan W, Dong L, Gao S, Liu X. Virulence traits and pathogenicity or uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotype. *Microb Pathog*. 2017;104:217–24.
6. Holt JG, Krieg NR. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. En: Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, editores. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 1994. p. 175–290.
7. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:123–40.
8. Liu X, Thungat K, Boothe DM. Multilocus sequence typing and virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in the United States. *PLoS Med*. 2007;4:e317.
9. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. Defining genomic islands and uropathogens-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007;189:3532–46.
10. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol*. 2014;46:175–81.
11. Munkhdelger Y, Gunregjav N, Dorpurev A, Juniichiro N, Sarantuya J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance or uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J Infect Dev Ctries*. 2017;11:51–7.
12. Obaid JM, Mansour SR, Elshahedy MS, Rabie TE, Azab AM. Uropathogenic *Escherichia coli* isolates with different virulence genes content exhibit similar pathologic influence on Vero cells. *Pol J Microbiol*. 2014;63:43–9.
13. Spurbek RR, Mobley HL. Uropathogenic *Escherichia coli*. En: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli* Pathotypes and principles of pathogenesis. 2nd ed Baltimore, Maryland: Academic Press; 2013. p. 275–304.
14. Tramuta C, Nucera D, Robino P, Salvarani S, Nebbia P. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *J Vet Sci*. 2010;12:49–55.
15. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995;12:85–90.