

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* SHIGATOXIGÊNICA  
(STEC) E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM CARCAÇAS  
E FEZES DE SUÍNOS ABATIDOS NA REGIÃO DE  
RIBEIRÃO PRETO - SP E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE  
DOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES  
ANTIMICROBIANOS**

**Clarissa Araújo Borges**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* SHIGATOXIGÊNICA  
(STEC) E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM CARÇAÇAS  
E FEZES DE SUÍNOS ABATIDOS NA REGIÃO DE  
RIBEIRÃO PRETO - SP E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE  
DOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES  
ANTIMICROBIANOS**

**Clarissa Araújo Borges**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila  
Co - orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

B732d Borges, Clarissa Araújo  
Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em carcaças e fezes de suínos abatidos na região de Ribeirão Preto – SP e perfil de susceptibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos / Clarissa Araújo Borges. – Jaboticabal, 2011  
vi, 43 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011  
Orientador: Fernando Antônio de Ávila  
Banca examinadora: José Moacir Marin, Antonio José Piantino Ferreira  
Bibliografia

1. Suínos. 2. Microbiologia. 3. Saúde Pública. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.993:636.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CLARISSA ARAÚJO BORGES** - nascida a 29 de dezembro de 1984 em Uberlândia - MG. Concluiu o Segundo Grau na Escola Séculus – em 2002. Iniciou o curso de Ciências Biológicas, no ano de 2003, na Universidade Federal de Uberlândia, concluindo em dezembro de 2007. Em 2009 iniciou o mestrado em Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP de Jaboticabal.

## **AGRADECIMENTOS**

Uma dissertação não é fruto do trabalho solitário, pelo contrário, ela é resultado da dedicação de várias pessoas. Por isto, aqui vão alguns agradecimentos àqueles que deram sua contribuição, de uma forma ou de outra, para que este objetivo fosse atingido.

Agradeço a Deus que nos ilumina sempre!

Aos meus queridos pais, Zacarias e Cíntia, pela dedicação por completo em todas as fases de minha vida, pelo exemplo de amor, apoio e estímulo. Tudo o que sou e tudo o que conquistei devo a eles;

À minha irmã, Cássia, por estar sempre presente mesmo que de longe. Obrigada por torcer tanto pela minha felicidade e, principalmente, por fazer parte dela;

Aos meus familiares, pela estrutura familiar proporcionada ao longo da minha vida, por acreditarem em mim e por me ajudarem, com compreensão, carinho e amor, a chegar ao fim desta etapa de minha vida. A todos, meus mais sinceros agradecimentos;

Ao Prof.Dr. Fernando Antônio de Ávila, por todo aprendizado durante este período e pela orientação e apoio;

Ao Mestre Renato Pariz Maluta devo um agradecimento especial por toda atenção e paciência dispensadas. Um amigo e companheiro no trabalho que guiou meus passos e me mostrou o que é ter dedicação e amor pela pesquisa;

À amiga Lívia Gerbasi Beraldo, pela ajuda em todas as etapas desse projeto, pelo apoio e companheirismo durante esses dois anos e principalmente pela sincera amizade, tanto dentro como fora da Universidade;

Às amigas Marita e Vanessa, pela excelente relação pessoal que criamos e que espero não se perca, por me fazerem rir e suportar as dificuldades encontradas;

Ao meu namorado André, que durante esses dois anos foi meu companheiro, amigo e conselheiro, me incentivando nos momentos de maior dificuldade. Obrigada pela paciência, carinho e amor que a mim tem dedicado;

Ao Prof.Dr. Everlon Cid Rigobelo pela co-orientação;

Ao João Quintana pelo apoio técnico e amizade e à secretária da Microbiologia Edna M. T. Daquila, pelo incentivo e apoio;

À CAPES pelo apoio e financiamento concedidos.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Origem das amostras.....	12
4.2. Isolamento e Identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	13
4.3. Extração do DNA bacteriano.....	13
4.4. Procedimento da PCR para detecção dos genes.....	14
4.5. Sensibilidade a antimicrobianos.....	16
4.6. Identificação sorológica dos sorogrupos .....	16
4.7. Diagrama do procedimento experimental.....	17
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÕES.....	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BFP- Fator de aderência denominado “Bundle forming pili”

CH - Colite hemorrágica

eae - “Attaching and effacing”

EAF - Plasmídeo de EPEC típica

Efa 1 - Fator de aderência de EHEC

Ehx - Hemolisina de EHEC

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

Iha - Adesina homóloga a IrgA de *Vibrio cholerae*

LEE - *Locus of enterocyte effacement*

LPF - Fímbria polar longa

μL - Microlitro

mL - Mililitro

mM - Milimolar

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

VT - Verotoxina

SHU - Síndrome hemolítica urêmica

STEC ou VTEC - *Escherichia coli* produtora de toxina shiga

Saa - Adesina autoaglutinante de STEC

Stx - Toxina Shiga

TEB - Solução tampão Tris-EDTA-Borato

UV - Ultra-violeta

Vero - Células renais de macaco verde africano

V - Volt



**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. "Primers" utilizados na PCR para amplificar fragmentos específicos dos genes codificadores de fatores de virulência.....	15
Tabela 2. Distribuição dos genes <i>stx2</i> e <i>eae</i> encontrados na PCR de triagem entre os diferentes locais de coleta.....	19
Tabela 3. Número, tipo e genótipo das 16 estipes isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos em três frigoríficos da região de Ribeirão preto, SP, Brasil.....	20
Tabela 4. Perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos das 16 estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de três frigoríficos da região de Ribeirão Preto - SP, durante o período de março a agosto de 2010.....	21

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Meia carcaça de suíno com indicação dos quatro pontos onde foram feitos os esfregaços com a esponja.....	12
Figura 2. Resumo do procedimento experimental.....	18
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene <i>eae</i> .....	22
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene <i>stx2</i> .....	22

## DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* SHIGATOXIGÊNICA (STEC) E ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) EM CARÇAÇAS E FEZES DE SUÍNOS ABATIDOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO - SP E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

**RESUMO** - *Escherichia coli* destaca-se entre os principais patógenos de importância na suinocultura e saúde pública e apresenta diversos patótipos, caracterizados pela presença de diferentes fatores de virulência. Os objetivos deste trabalho foram detectar genes de virulência e determinar a sua frequência, bem como caracterizar o perfil de resistência às drogas antimicrobianas de estirpes de *E. coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos na região de Ribeirão Preto - SP. Esse estudo foi conduzido com 226 amostras de fezes e 215 amostras de carcaça de suínos colhidas de três diferentes abatedouros. As estirpes isoladas foram submetidas ao teste bioquímico para confirmação da espécie, teste de suscetibilidade a antimicrobianos, teste para determinação dos sorogrupos e PCR para detecção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, *efa1*, *saa*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *toxB*, *iha* e *bfp*, foram isolados 3,4% de EPEC e 0,2% de STEC. Os fatores de virulência foram encontrados em quatro diferentes combinações: *eae* + *lpfA*<sub>O113</sub> (1,6%); *eae* (1,4%); *eae* + *toxB* + *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> + *ehxA* (0,4%) e *stx2* (0,2%). Não houve isolados positivos para os genes *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *saa*, *efa1*, *iha* e *bfp*. Todos os isolados foram sensíveis à nitrofurantoína e 93,75% resistentes à tetraciclina. Os resultados mostraram que amostras provenientes de suínos da região de Ribeirão Preto-SP apresentaram *E. coli* que contêm genes de virulência associados a STEC e EPEC. Esse fato é um alerta para que esses animais sejam monitorados, pois podem ser potenciais reservatórios de STEC e EPEC causadoras de doenças em humanos.

**Palavras-Chave:** abatedouro, *Escherichia coli*, genes de virulência, suínos

**DETECTION OF SHIGA TOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* (STEC) AND  
ENTEROPATHOGENIC (EPEC) IN FECES AND CARCASS FROM SWINE  
SLAUGHTERED IN THE REGION OF RIBEIRÃO PRETO – SP  
AND SUSCEPTIBILITY PROFILE OF THE STRAINS ISOLATED FRONT  
DIFFERENTS ANTIMICROBIALS**

**SUMMARY** - *Escherichia coli* stands out among the main pathogens of importance to the swine industry and public health and presents several pathotypes characterized by the presence of different virulence factors. The aims of this study were to determine the frequency, detect virulence genes and characterize the resistance profile to antimicrobial drugs of Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains isolated from feces and carcasses of pigs slaughtered in the region of Ribeirão Preto – SP. This research was carried out with 226 fecal samples and 215 carcasses samples from swine collected from three different slaughterhouses. The strains isolated were submitted to antimicrobial susceptibility test, biochemical test to confirm the specie, test to determine the serogroups and PCR for detection of genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, *efa1*, *saa*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *toxB*, *iha* and *bfp*, 0,2% of STEC and 3,4% of EPEC were isolated. The virulence factors were found in four different combinations: *eae* + *lpfA*<sub>O113</sub> (1,6%); *eae* (1,4%); *eae* + *toxB* + *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub> + *ehxA* (0,4%) and *stx2* (0,2%). There were no positive isolate for genes *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *saa*, *efa1*, *iha* and *bfp*. All isolates were susceptible to nitrofurantoin and 93.7% resistant to tetracycline. The results showed that samples from swines in the region of Ribeirão Preto have *E. coli* containing virulence genes associated with EPEC and STEC strains. This fact is a warning that these animals should be monitored because they can be potential reservoirs of STEC and EPEC that cause disease in human.

**Keywords:** *Escherichia coli*, slaughterhouse, swines, virulence genes

## I. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade de grande importância para a economia mundial. O Brasil é o quarto país em produção e o sexto em consumo de produtos derivados de suínos. A suinocultura brasileira desempenha importante função em todos os setores da economia no Brasil, gerando empregos, intensificando a demanda de insumos agropecuários, na industrialização e na comercialização de produtos de origem animal; obtendo divisas ao exportar carnes e se constitui numa excelente fonte de proteína animal.

A carne suína e seus produtos derivados sofrem contaminações e possíveis alterações bacterianas em função de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como: sanidade animal, criação zootécnica (raça, tipo de manejo, alimentação, prevenção de doenças pelo uso adequado de vacinas), pH, potencial de oxi-redução e umidade da própria carne. Estes fatores podem determinar contaminações cruzadas, resultando em carnes com elevada carga bacteriana e possível contaminação de origem fecal, onde *Escherichia coli* se destaca no cenário nacional e internacional como um microrganismo de importância em sanidade animal, higiênico-sanitária e saúde pública.

*Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) representam duas das seis diferentes categorias de *E. coli* diarreiogênicas que causam doença em humanos. STEC é um importante agente causador de colite hemorrágica (CH) no homem, que pode evoluir para complicações extraintestinais graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica (PTT). Dentre EPEC, as típicas (EPECt) são responsáveis pela diarreia aguda em crianças de até um ano de idade em países em desenvolvimento e as atípicas (EPECa) são responsáveis pela diarreia aguda em crianças e adultos tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados.

A doença do edema em suínos se desenvolve como resultado de infecções causadas por STEC, enquanto EPEC está relacionada à ocorrência de diarreias neonatais e pós-desmame. A infecção por EPEC pode ser adquirida pela ingestão

desses microrganismos em água e comida contaminada, sendo o problema agravado quando há subnutrição. STEC podem entrar na cadeia de alimentação humana de várias maneiras, mas freqüentemente entram pela contaminação direta ou indireta da carne, após o abate, com fezes ou conteúdo intestinal contendo o patógeno.

A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto, no ano de 2005, cerca de 1,8 milhões de pessoas morreram por doenças diarréicas e em altas proporções desses casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo e anaeróbio facultativo. Faz parte de um grupo de bactérias cujos membros são tipicamente não patogênicos e compõem a microbiota intestinal de humanos e animais (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004). Este microrganismo, isolado de fezes de neonatos foi descrito primeiramente em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodore Escherich como “*Bacterium coli commune*”. Muitos estudos sobre o metabolismo e os processos bioquímicos dessa bactéria foram conduzidos e tornaram-se a base para o estudo das enterobactérias em geral e da *Escherichia coli* em particular (GYLES, 1994).

Em hospedeiros debilitados, imunossuprimidos ou quando a barreira fisiológica do intestino é rompida, cepas não patogênicas de *E. coli* podem causar infecções (NATARO & KAPER, 1998). Entretanto, algumas cepas de *E. coli* representam importantes patógenos potencialmente hábeis em causar doenças. Esses patógenos têm sido classificados em duas principais categorias: patógenos entéricos e extra-intestinais (KUHNERT et al., 2000).

A tipagem sorológica tem sido amplamente utilizada para caracterizar *E. coli*. Porém, uma vez que os fatores de virulência estão mais diretamente associados com a patogenicidade do que os antígenos de superfície, apenas a sorologia não é adequada para caracterizar cepas de *E. coli* como patogênicas. Essa identificação baseia-se, sobretudo na presença de genes de virulência associados a cada categoria do enteropatógeno e utiliza-se principalmente métodos moleculares (NATARO & KAPER, 1998).

*E. coli* associadas a infecções intestinais foram classificadas em seis patótipos com base na identificação de propriedades de virulência específicas, de sinais clínicos e sintomas gerados no hospedeiro, e em alguns casos, da ocorrência de determinados sorotipos (NATARO & KAPER, 1998). Esses patótipos compreendem: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere

difusamente (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998). Linhagens pertencentes a cada categoria utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, conseqüência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade, além da presença de bacteriófagos (PATON & PATON, 1998).

EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* reconhecido como causa de diarreia, em 1945, quando John Bray descreveu estirpes sorologicamente distintas que foram isoladas de crianças com diarreia, mas não de crianças saudáveis (KAPER et al., 2004). Essas bactérias causam doença primariamente em crianças menores de 2 anos de idade. Uma hipótese proposta para explicar a razão da resistência relativa de adultos e crianças mais velhas é a perda de receptores específicos com a idade (NATARO & KAPER, 1998).

No Brasil EPEC é o grupo de *E. coli* diarreiogênica isolado com maior frequência e é responsável por cerca de 30,0% dos casos de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses, com predominância dos sorotipos O111: [H], O111[H2], O119:H6 e O55:H6 (FRANZOLIN et al., 2005; GIRÃO et al., 2006). Diarreia aquosa e profusa, vômito e febre baixa são sintomas comuns da infecção por EPEC. Leucócitos fecais, que são um achado característico de bactérias invasoras, não são observados em pacientes infectados por EPEC (MILLER et al., 1994). Na mucosa intestinal ocorre a formação da lesão do tipo A/E, associada com o desarranjo do sistema enzimático digestivo-absortivo, levando a má absorção dos nutrientes (FAGUNDES-NETO, 1996). Como nas outras *E. coli* causadoras de diarreia, a transmissão de EPEC é pela via oral-fecal, através de mãos contaminadas, alimentos originalmente contaminados, manipulação inadequada e fômites (LEVINE & EDELMAN, 1984).

O mecanismo central da infecção causada por EPEC é a formação de lesões intestinais denominadas *attaching and effacing* (A/E), causadas pela habilidade da bactéria aderir intimamente aos enterócitos, destruir as microvilosidades e induzir alterações no citoesqueleto incluindo o acúmulo de actina polimerizada e a formação de estruturas em pedestal nos locais onde a bactéria adere (DONNENBERG & WHITTAM,



2001; TRABULSI et al., 2002). A formação da lesão A/E depende da expressão de vários genes localizados em uma região de 35 kb do cromossomo de EPEC, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE), que é considerada uma ilha de patogenicidade porque contém vários genes associados com virulência, e não é encontrada em estirpes de *E. coli* não patogênicas (MCDANIEL, et al., 1995; DONNENBERG & WHITTAM, 2001).

Intimina é uma proteína de membrana externa necessária para a formação das lesões A/E. É codificada pelo gene *eae* presente na LEE (JERSE et al., 1990). A intimina é responsável pela adesão íntima da EPEC às células epiteliais através da ligação com o receptor Tir (*translocated intimin receptor*), que é sintetizado pela bactéria, translocado e inserido na membrana citoplasmática da célula hospedeira (DONNENBERG & WHITTAM, 2001). O plasmídeo EAF não é essencial para a formação das lesões A/E, mas aumenta a eficiência da formação das mesmas (TRABULSI et al., 2002).

O modelo para a patogênese de EPEC indica que a bactéria inicialmente adere às células epiteliais através de uma adesina cuja identidade ainda não foi estabelecida. O sistema de secreção tipo III codificado pela LEE é ativado e várias proteínas efetoras incluindo Tir, são translocadas para o interior da célula hospedeira. EPEC então se liga à célula hospedeira através da interação da intimina com Tir inserido na membrana, e numerosas proteínas do citoesqueleto acumulam-se sob o local onde a bactéria está ligada. As proteínas translocadas ativam vias de transdução de sinal nas células eucarióticas, e a diarreia provavelmente resulta de múltiplos mecanismos, incluindo a secreção ativa de íons, permeabilidade aumentada, perda da superfície absorptiva resultante da destruição das microvilosidades (KAPER et al., 2004).

Em 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, foi aprovada a seguinte definição de EPEC “estirpes diarreiogênicas de *E. coli* que produzem uma lesão característica denominada *attaching and effacing* (A/E) nas células intestinais e que não produzem toxinas Shiga. EPEC típica de origem humana possui o plasmídeo de virulência EAF que codifica o *bundle-forming pilus* (BFP), necessário para a adesão

localizada (LA) em células epiteliais, e um complexo regulador de vários genes de virulência, enquanto EPEC atípica (EPECa) não possui este plasmídeo”.

EPEC típicas correspondem aos sorotipos clássicos de EPEC e são causas importantes de diarreia em países em desenvolvimento, mas raras nos países industrializados, onde as atípicas são a principal causa de diarreia (TRABULSI et al., 2002). No Brasil até a década de 90 uma elevada frequência de EPEC típica era observada, no entanto, estudos recentes têm demonstrado aumento na frequência de EPECa como causa de diarreia (FRANZOLIN et al., 2005).

Dentre as distintas categorias de *E. coli* diarreio gênicas, STEC merecem destaque como bactérias emergentes relacionadas com a ingestão de alimentos, uma vez que a doença causada por estas bactérias varia desde uma diarreia branda até severas diarreias sanguinolentas (colites hemorrágicas – CH) que podem evoluir para complicações extraintestinais graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica (PTT) (MORA et al., 2005).

Desde 1982, quando foi identificada como patógeno, STEC O157:H7 vem sendo apontada como causa de surtos que ocorreram primariamente no Canadá, Japão, Reino Unido e Estados Unidos (MORA et al., 2005). Em 1977, KONOWALCHUK et al. descreveram que algumas cepas de *E. coli* eram capazes de produzir uma toxina, referida como Verotoxina (VT), que induzia um efeito citotóxico distinto e irreversível em células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano). No entanto, estudos conduzidos por O'BRIEN et al. (1982), demonstraram que o efeito citotóxico produzido por estas amostras de *E. coli* em células de adenocarcinoma de colo uterino humano (células HeLa) podia ser neutralizado através do uso de anti-soro contra toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Desta forma, a toxina VT produzida por este grupo de *E. coli* passou a ser designada, pela maioria dos autores, de “Shiga-like toxin” (SLT).

RILEY et al. (1983) isolaram cepas de *E. coli* do sorotipo O157:H7 em um surto nos Estados Unidos associado à ingestão de hambúrguer mal cozido que apresentou sintomas como: dores abdominais, diarreia aquosa seguida de diarreia sanguinolenta, febre baixa ou ausente, caracterizando um quadro clínico denominado de colite hemorrágica. As amostras de *E. coli* isoladas neste surto revelaram a presença de SLT.

Em um estudo realizado posteriormente, O'BRIEN et al. (1983) demonstraram que SLT e a citotoxina Vero eram a mesma toxina. Concluiu-se, então, que a citotoxina Vero e STL eram fatores de virulência comumente encontrados em casos de CH e SHU (KARMALI et al., 1983). A adoção do termo Stx para a toxina Shiga padronizou a sua nomenclatura, embora grupos distintos de pesquisadores ainda designem esta citotoxina como VT (Toxina Verocitotoxigênica) (CALDERWOOD et al., 1996).

Mais de 200 sorotipos de *E. coli* apresentam a capacidade de produzir Stx, entretanto o sorotipo O157:H7 tem sido considerado o mais importante (NATARO & KAPER, 1998.), por estar associado a surtos de colite hemorrágica já descritos em literatura, e a um significativo número de óbitos, sendo que o maior surto ocorreu no Japão (RILEY et al., 1983; MICHINO et al., 1999; LICENCE et al., 2001). Cepas de STEC isoladas de humanos e de animais que causam infecções em humanos pertencentes a um grande número de sorotipos O:H não-O157 estão associados a um número estimado de 37 mil mortes por ano (MORA et al., 2005).

As toxina Shiga é o principal fator de virulência de STEC, responsável pelas principais manifestações da colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (PATON & PATON, 1998; TARR et al., 2005). Pertence à família das toxinas do tipo AB e são codificadas em operons que têm uma estrutura comum, onde a região que codifica a subunidade A precede a da subunidade B. As toxinas Shiga são compostas por uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade A é responsável pela toxicidade e tem atividade de RNA-*N*-glicosidase. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor Gb3 presente na superfície das células do hospedeiro. Uma vez ligada à célula alvo, a subunidade A é internalizada por endocitose e quebra uma ligação *N*-glicosídica específica na subunidade 28S do rRNA, removendo um resíduo de adenina, inibindo o processo de síntese de proteínas e causando morte celular (ENDO et al., 1988; KAPER et al., 2004). As toxinas Shiga são produzidas no intestino, mas podem causar complicações sistêmicas através de uma combinação de toxicidade direta e indução da produção de citocinas (KAPER et al., 2004; TARR et al., 2005).

Existem dois grupos principais de toxinas Shiga, Stx1 e Stx2, classificados inicialmente com base nas suas propriedades imunológicas. Essas toxinas são

codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente. Stx1 é praticamente idêntica a Stx produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1 e reage cruzado com anticorpos anti Stx. Stx2 é imunologicamente diferente da Stx1, não reage com anticorpos anti-Stx1, embora essas toxinas sejam biologicamente e estruturalmente similares. A diferença entre Stx1 e Stx é de apenas um aminoácido na subunidade A, enquanto que Stx2 apresenta 56% de similaridade na seqüência de aminoácidos com as duas outras toxinas (JACKSON et al., 1987; PATON & PATON, 1998).

Variantes de Stx1 e Stx2 foram descritas. O grupo Stx1 apresenta poucas variantes que diferem discretamente na seqüência de nucleotídeos, sem conseqüências sobre as suas características antigênicas e toxicidade (PATON et al., 1995; ZHANG et al., 2002; MAINIL & DAUBE, 2005). Para Stx2 cerca de 20 variantes, que diferem mais em termos de seqüência de nucleotídeos, antigenicidade e toxicidade, foram descritas (NAKAO et al., 2002; MAINIL & DAUBE, 2005).

Algumas estirpes de STEC compartilham com EPEC a capacidade de causar as lesões do tipo A/E na mucosa intestinal, também contêm o *locus of enterocyte effacement* (LEE) e conseqüentemente o gene *eae* que codifica a intimina. A LEE encontrada nas estirpes de STEC apresenta 93,9% de homologia na seqüência de nucleotídeos com àquela presente na EPEC, e o gene *eae* destes dois patótipos apresentam 87,2% de identidade (FRANKEL et al., 1998). A intimina e a toxina Stx2 são os fatores de virulência que estão associados mais freqüentemente com estirpes de STEC isoladas de humanos, particularmente com as doenças severas como a SHU (BOERLIN et al., 1999). No entanto, a presença da LEE não é essencial para a patogenia de STEC, pois um grande número de casos de doenças, incluindo SHU, tem sido causadas por estirpes LEE negativas (PATON et al., 1999).

A síndrome clínica provocada pelas STEC é caracterizada por intensas cólicas abdominais e diarréia abundante, inicialmente aquosa, mas que rapidamente evolui para sanguinolenta, com presença de coágulos, sem leucócitos nas fezes e manifestando-se em pacientes sem febre durando em média oito dias (RILEY et al., 1983). Alguns pacientes com SHU podem apresentar sintomas neurológicos como letargia, fortes dores de cabeça, convulsões e encefalopatia (TESH & O'BRIAN, 1991).

STEC patogênicas ao homem podem pertencer a diversos sorogrupos, entretanto O157, O111, O113 e O26 são os mais comumente envolvidos (PATON & PATON, 1999). *E. coli* produtoras de toxina shiga-like podem estar presente na flora fecal de uma grande variedade de animais incluindo além dos bovinos os ovinos, caprinos, suínos, felinos, cães e galinhas (BEUTIN, 1993).

STEC e EPEC também podem albergar o gene *ehxA* que está contido em um plasmídeo de 90 kb, que codifica uma hemolisina pertencente à família das RTX (toxina com repetições), denominada enterohemolisina de EHEC (Ehx), responsável pela formação de poros (SCHIMIDT et al., 1994; BOERLIN et al., 1999; COOKSON et al., 2007) . A produção de enterohemolisina também tem sido associada com doenças de maior severidade, mas a maneira como contribui para a patogênese de STEC ainda não é bem compreendida. Uma possibilidade é que a liberação da hemoglobina, devido à lise dos eritrócitos, sirva como fonte de ferro estimulando o crescimento do microrganismo (BAUER & WELCH, 1996).

A adesão à mucosa intestinal constitui a primeira e essencial etapa para a colonização das células e para o desenvolvimento da infecção, e na ausência do LEE, pouco se sabe como essas amostras colonizam o hospedeiro (PATON, et al., 1998). Alguns produtos codificados por genes presentes no cromossomo ou em plasmídeos desempenham um papel importante na virulência de amostras STEC. Esses produtos podem incluir adesinas e toxinas. Muitas dessas adesinas têm sido relacionadas à aderência da bactéria em culturas de células (GYLES, 2007). As adesinas não fimbriais incluem Efa1, Iha, ToxB e Saa. E as fimbriais incluem principalmente LpfA.

Destas proteínas, ToxB possui 71,0% de homologia com a proteína Efa1, possui 93Kb e é codificada pelo plasmídeo O157 e é necessária para a completa aderência do sorotipo O157:H7, cepa Sakai de STEC (TATSUNO et al., 2001). TARR et al. (2000) descreveram Iha (adherence-conferring protein), uma proteína de membrana externa de 67 kDa, que apresenta homologia com gene *IrgA* de *Vibrio cholerae*, um gene de regulação de ferro. Está amplamente presente em amostras LEE-positivas e LEE-negativas. Apesar dos estudos de adesão realizados, o gene *iha* parece não codificar

uma adesina e sim tem a função de aumentar a expressão de outra adesina, aumentando desta forma a adesão às células (TATARCZAK et al., 2005).

Saa é uma proteína de membrana externa que funciona como adesina autoaglutinina, semelhante à YadA de *Yersinia* spp. Localiza-se no plasmídeo O113 e foi descrita por PATON et al. (2001). Sugere-se que o gene *saa* está presente somente em amostras LEE-negativas e principalmente em amostras relacionadas com surtos de SHU (PATON et al., 2001). DOUGHTY et al. (2002) descreveram o gene *lpfA*. Este gene fimbrial cromossomal foi identificado em EHEC O113:H21 LEE-negativas e estaria relacionado com “Long Polar Fimbriae” (LPF). Esta fimbria do tipo I foi descrita pela primeira vez em *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium (BAUMLER & HEFFRON, 1995). DOUGHTY et al. (2002) observaram que após a deleção da maior subunidade do gene *lpfA*, ocorreu uma significativa redução na aderência da EHEC O113:H21 (EH41) em células CHO-K1.

Os antimicrobianos, quando usados como promotores de crescimento na alimentação animal, podem exercer forte pressão seletiva sobre os patógenos e a microbiota saprofítica, principalmente quando utilizados abusivamente, podendo resultar no aparecimento de resistência quer seja na microbiota saprofítica e/ou patogênica, em dependência da codificação de genes para resistência antimicrobiana pela ação de plasmídios e transposons (FRANCO et al., 2010). A ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas humanas (MANTILLA et al., 2008).

A importância econômica da suinocultura, o potencial de transmissão de EPEC e STEC dos suínos para o homem e a possível emergência de isolados multirresistentes justificam a realização desse trabalho.

### III. OBJETIVOS

1. Determinar a frequência de STEC e EPEC isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos na região de Ribeirão Preto - SP;
2. Determinar os genes de virulência das estirpes de *E. coli* (*stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, *efa1*, *saa*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *toxB*, *iha* e *bfp*) isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos através da técnica da PCR;
3. Identificar bioquimicamente e detectar os sorogrupos das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos;
4. Determinar o perfil de resistência das estirpes de STEC e EPEC isoladas de fezes e de carcaças de suínos abatidos frente a diferentes drogas antimicrobianas.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Origem das amostras

Foram utilizadas 226 amostras de fezes e 215 amostras de carcaças de suínos colhidas de três diferentes abatedouros do Estado de São Paulo, no período de março a agosto de 2010. As amostras de fezes foram colhidas, diretamente do reto utilizando suabe estéril, enquanto os animais estavam no curral de espera. Após o abate e processo de higienização, em uma área de 100 cm<sup>2</sup> nas carcaças dos animais fez-se um esfregaço utilizando uma esponja estéril embebida em água peptonada. O suabe oriundo da coleta do reto foi depositado em um tubo contendo água peptonada, e a esponja oriunda da coleta de material da carcaça foi depositada em um saco estéril contendo água peptonada. A Figura 1 mostra os locais onde foram feitos os esfregaços com a esponja nas carcaças.

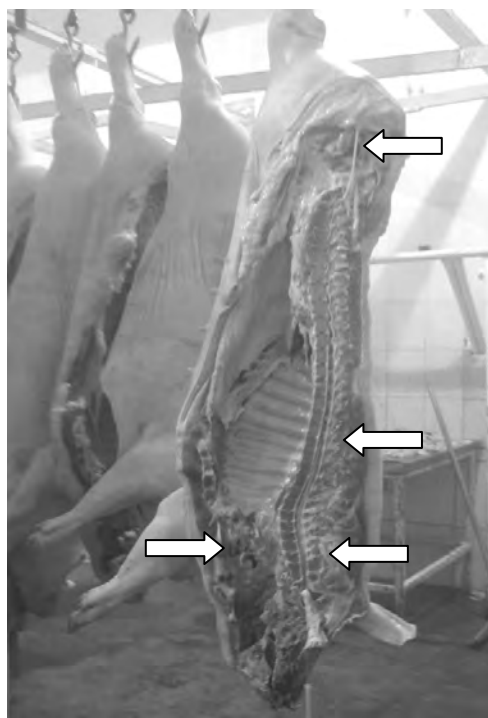


Figura 1. Meia carcaça de suíno com indicação dos quatro pontos onde foram feitos os esfregaços com a esponja



## 4.2. Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Para o isolamento de *E. coli*, cada suabe contendo as amostras de fezes em tubo com 5 mL de água peptonada e cada esponja contendo as amostras de carcaça embebida em 20 mL de água peptonada, foram agitados manualmente, e destes, 1 mL foi transferido para outros tubos contendo 5 mL de caldo verde brilhante (VB) e incubados a 35°C por 24h. Após a incubação, cada cultura, tanto de fezes quanto de carcaça, foi semeada diretamente em ágar MacConkey e incubada a 35°C por 24h. O DNA template foi preparado a partir do crescimento confluyente do ágar MacConkey, para fazer uma triagem através da PCR multiplex para a detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*. As culturas confluentes positivas na PCR de triagem foram isoladas e testadas por PCR novamente, a fim de confirmar a presença dos genes *stx* e *eae*. As colônias positivas na PCR confirmatória foram semeadas em placas contendo ágar infusão de cérebro coração (BHI), obtendo-se assim colônias isoladas e identificadas como STEC ou EPEC. Todas as colônias puras de *Escherichia coli* foram submetidas aos testes de fermentação da lactose, produção de indol, reações de vermelho de metila e Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease e produção de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S), após incubação por 24 a 72 horas a 37° C (STELLA et al., 2008), analisadas por PCR para se pesquisar a presença dos genes *ehxA*, *efa1*, *saa*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *toxB*, *iha* e *bfp* e submetidas a testes de sensibilidade a antimicrobianos. Os isolados foram estocados em freezer a -80°C.

## 4.3. Extração do DNA bacteriano

O DNA microbiano foi extraído segundo a técnica proposta por KESKIMAKI et al. (2001) com pequenas modificações. A colônia de *E. coli* isolada foi semeada e incubada a 37° C, por 12 horas, em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI. Após a incubação, transferiu-se 1 mL da cultura em caldo BHI para um tubo eppendorf e centrifugou-se a 12.000 rpm por 2 minutos para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de TEB,

agitadas em vortex por 30 segundos e centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante, a cultura bacteriana foi novamente precipitada e agora ressuspendida por 500  $\mu$ L de água Milique estéril e agitada em vortex por 30 segundos. O tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos em água fervente (100° C). Após esse tempo, as células foram precipitadas através de centrifugação 12.000 rpm durante 2 minutos e retirou-se uma alíquota de 300 $\mu$ L do sobrenadante fervido e transferido para outro tubo eppendorf. Esse material foi estocado em freezer a -20° C até o momento de uso.

#### 4.4. Procedimento da PCR para detecção dos genes

A reação de PCR multiplex foi realizada empregando os seguintes parâmetros: uma alíquota de DNA (4 $\mu$ L) foi acrescentada à mistura contendo 0,4 $\mu$ L de dNTP (2 mM), 3,6 $\mu$ L de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl [pH 8.8] 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,8 $\mu$ L de cada primer (40 mM) e 0,2 $\mu$ L Taq DNA polimerase, obtendo um volume total de 20  $\mu$ L completado com água MiliQ. Os ciclos de amplificação foram feitos em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient nas seguintes condições: t<sub>1</sub>, 5 min a 94°C; t<sub>2</sub>, 30 seg a 94°C; t<sub>3</sub>, 45 seg a 50°C; t<sub>4</sub> 1 min a 72°C (t<sub>2</sub>-t<sub>4</sub>, 25 ciclos repetidos) e t<sub>5</sub> 7 min a 72°C. Nas PCRs duplex (*iha*, *toxB*) e simples foi usado o mesmo parâmetro mudando apenas as temperaturas de anelamento, que foram 53°C, 52°C, 39°C, 49°C, 59°C, 55°C, 47°C e 56°C, respectivamente para as PCRs duplex (*iha*, *toxB*) e simples (*saa*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *ehxA*, *efa1* e *bfp*).

O produto da reação acrescentado de 5 $\mu$ L de carga de tintura (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) e o marcador molecular de 100 pb foram aplicados em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1 $\mu$ g/mL) em tampão TEB e separados por eletroforese (70V/1h40). O produto de amplificação foi visualizado por exposição do gel em luz UV e fotografado. Iniciadores (primers) e tamanho dos fragmentos produzidos utilizados na PCR para a detecção dos genes estão caracterizados na Tabela 1.

Tabela 1. "Primers" utilizados na PCR para amplificar fragmentos específicos dos genes codificadores de fatores de virulência

Gene	Seqüência do oligonucleotídeo iniciador (Primer) (5'→3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>stx<sub>1</sub></i>	AGAGCGATGTTACGGTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG TGGGTTTTTCTTCGGTATC	388	China et al (1996)
<i>stx<sub>2</sub></i>	GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	China et al (1996)
<i>eae</i>	AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	570	China et al (1996)
<i>ehxA</i>	CACACGGAGCTTATAATATTCTGTCA AATGTTATCCATTGACATCATTTGACT	340	Schmidt et al (1995)
<i>bfp</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300	Vidal et al (2004)
<i>efa1</i>	GAGACTGCCAGAGAAAG GGTATTGTTGCATGTTTCAG	479	Nicholls et al (2000)
<i>saa</i>	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC	119	Paton & Paton (2002)
<i>iha</i>	CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC GTA TGG CTC TGA TGC GAT G	1305	Schmidt et al (2001)
<i>toxB</i>	ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C	602	Tarr et al (2002)
<i>lpfA<sub>O113</sub></i>	ATG AAG CGT AAT ATT ATA G TTA TTT CTT ATA TTC GAC	573	Doughty et al (2002)
<i>lpfA<sub>O157/OI-141</sub></i>	CTG CGC ATT GCC GTA AC ATT TAC AGG CGA GAT CGT G	412	Szalo et al (2002)
<i>lpfA<sub>O157/OI-154</sub></i>	GCA GGT CAC CTA CAG GCG GC CTG CGA GTC GGC GTT AGC TG	525	Toma et al (2004)

#### 4.5. Sensibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados de *Escherichia coli* foram submetidos a testes de sensibilidade frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), estreptomicina (10µg), gentamicina, (10µg), ácido nalidíxico (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), nitrofurantoína (300µg) e sulfametoxazol+trimetoprim (25µg). O método foi o descrito pelo NCCLS (2003). Para a realização desses testes as cepas isoladas foram repicadas em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubadas a 37° C até atingirem o padrão 0,5 de MacFarland. Após a incubação as culturas diluídas foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, os discos contendo os antimicrobianos foram colocados. A leitura foi realizada após 18h de incubação a 37° C através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com um guia CLSI (2005).

#### 4.6. Identificação sorológica dos sorogrupos

Os isolados de *Escherichia coli* foram identificados através da pesquisa do antígeno O (sorogrupo). Os antissoros utilizados foram os polivalentes e monovalentes da PROBAC. O polivalente A contém anticorpos contra *E. coli* O26, O55, O111 e O119, o polivalente B contém anticorpos contra *E. coli* O114, O125, O142 e O158 e o polivalente C contém anticorpos contra *E. coli* O86, O126, O127 e O128. Os monovalentes contêm anticorpos contra cada um dos sorogrupos anteriores separadamente.

Para se evitar reações cruzadas, inicialmente foram utilizados os soros polivalentes A e B, não ocorrendo aglutinação foi utilizado o soro polivalente C. Ocorrendo aglutinação com um dos polivalentes, foram realizadas as provas de aglutinação usando os monovalentes correspondentes. Quando a aglutinação ocorreu em mais de um dos monovalentes, foi realizada a aglutinação em tubo, utilizando os

soros monovalentes diluídos 1/500 (considerando o título dos monovalentes 1/10). As aglutinações que ocorreram na diluição de 1/500 foram consideradas específicas. A pesquisa do sorogrupo é considerada negativa quando:

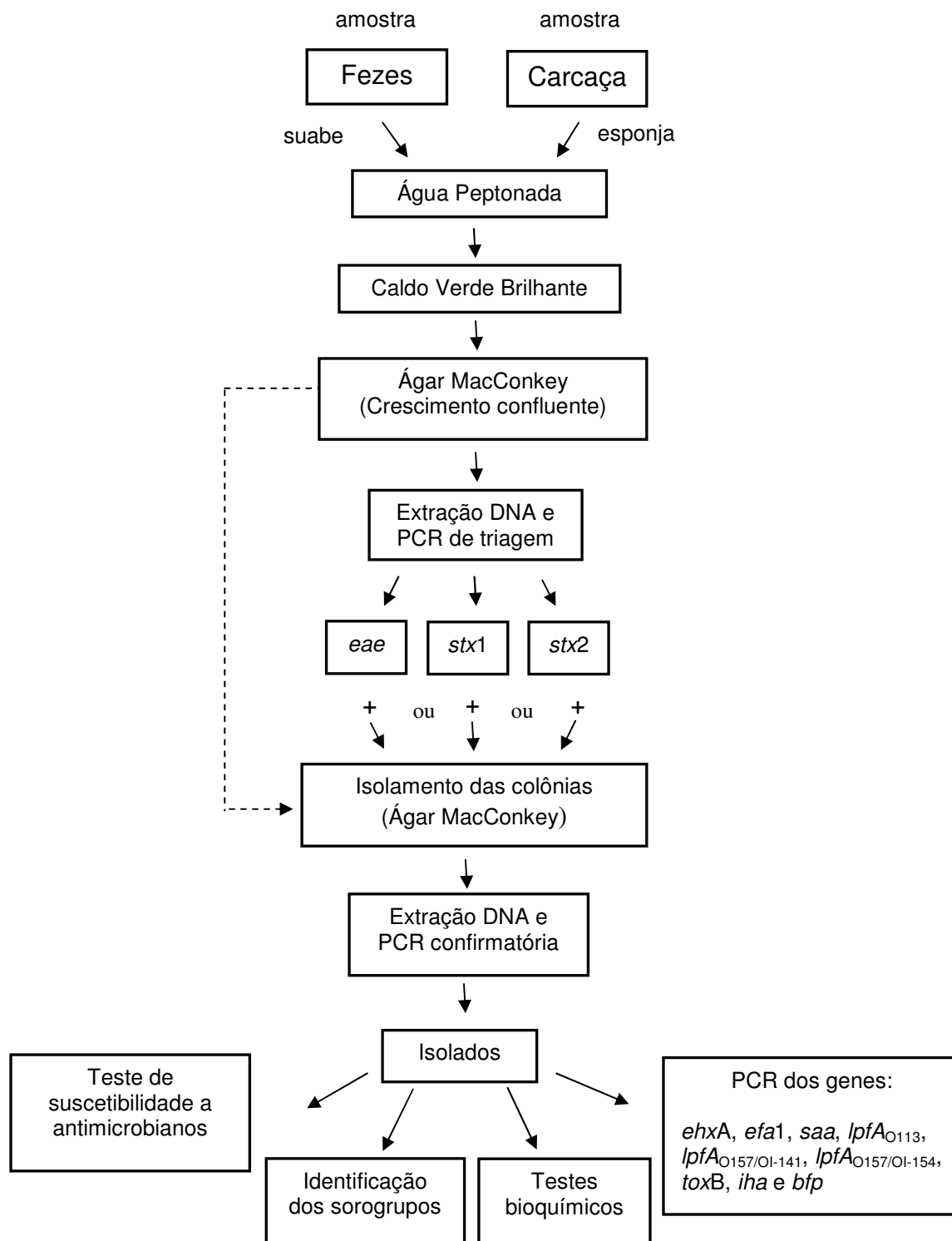
- As culturas não aglutinarem nos soros polivalentes A, B ou C.
- As culturas aglutinarem em mais de um soro polivalente.
- As culturas aglutinarem em um dos soros polivalentes, mas não aglutinarem nos monovalentes correspondentes.
- Em caso de reações cruzadas, nenhuma das culturas aglutinar a 1/500.
- A reação de aglutinação demorar mais que dois minutos e for parcial.

Foi utilizada a técnica de aglutinação em lâmina, com lâminas bem limpas e desengorduradas com álcool. A suspensão bacteriana utilizada foi bastante espessa e proporção suspensão/antissoro foi de 10 µL cada.

#### **4.7. Diagrama do procedimento experimental**

A Figura 2 descreve de forma resumida o procedimento experimental desse trabalho.

Figura 2. Resumo do procedimento experimental



## V. RESULTADOS

Das 441 amostras estudadas, 141 (32%) foram positivas na PCR de triagem. A Tabela 2 mostra a distribuição dos genes *stx2* e *eae* positivos na PCR de triagem entre os locais de coleta.

Tabela 2. Distribuição dos genes *stx2* e *eae* encontrados na PCR de triagem entre os diferentes locais de coleta.

	Frigorífico 1a*		Frigorífico 1b**		Frigorífico 2***		Frigorífico 3****	
	Reto	Carcaça	Reto	Carcaça	Reto	Carcaça	Reto	Carcaça
<i>stx2</i>	0	0	13	4	3	2	15	4
<i>eae</i>	17	3	25	25	13	3	2	1
<i>stx2+eae</i>	5	0	2	1	0	0	2	1

\*Frigorífico localizado na cidade de Guariba - SP, coleta a

\*\* Frigorífico localizado na cidade de Guariba - SP, coleta b

\*\*\* Frigorífico localizado na cidade de Ipuã – SP

\*\*\*\* Frigorífico localizado na cidade de Ariranha - SP

Foram isoladas uma (0,2%) estirpe possuindo o gene *stx2* e 15 (3,4%) estirpes possuindo o gene *eae*, todas essas oriundas da coleta b do frigorífico 1. Na Tabela 3 pode-se observar as características das 16 estirpes isoladas.

Tabela 3. Número, tipo e genótipo das 16 estirpes isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos em três frigoríficos da região de Ribeirão preto, SP, Brasil.

CARÇAÇAS			FEZES		
Quantidade	Patótipo	Virótipo	Quantidade	Patótipo	Virótipo
1	EPEC	<i>lpfA</i> <sub>O157/OI-141</sub> + <i>ehxA</i> + <i>eae</i> + <i>toxB</i>	1	EPEC	<i>lpfA</i> <sub>O157/OI-141</sub> + <i>ehxA</i> + <i>eae</i> + <i>toxB</i>
4	EPEC	<i>eae</i> + <i>lpfA</i> <sub>O113</sub>	3	EPEC	<i>eae</i> + <i>lpfA</i> <sub>O113</sub>
2	EPEC	<i>eae</i>	4	EPEC	<i>eae</i>
1	STEC	<i>stx2</i>			

Nenhuma estirpe continha os genes *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *saa*, *efa1*, *iha* e *bfp* e nove (56,2%) apresentaram mais de um gene de virulência. Não foi possível sorotipar nenhum isolado com a bateria de antissoros usada. A tabela 4 mostra o resultado do teste de antibiograma com as estirpes de *E. coli* frente aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, estreptomicina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, nitrofurantoína e sulfametoxazol + trimetoprim. O antimicrobiano nitrofurantoína foi o que apresentou melhor resultado com 100,0% das estirpes testadas sensíveis, e 75,0% delas apresentaram multirresistência, isto é, resistência a mais de três tipos de antimicrobianos.



Tabela 4. Perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos das 16 estirpes de *E. coli* isoladas de três frigoríficos da região de Ribeirão Preto - SP, durante o período de março a agosto de 2010.

Antimicrobiano	Total de isolados				Total
	Sensíveis		Resistentes		
	n	%	n	%	
Nitrofurantoína	16	100.0	0	0.0	16
Ciprofloxacina	15	93.7	1	6.3	16
Sulfametoxazol+trimetoprim	14	87.5	2	12.5	16
Gentamicina	13	81.3	3	18.7	16
Cloranfenicol	10	62.5	6	37.5	16
Ampicilina	8	50.0	8	50.0	16
Estreptomicina	7	43.7	9	56.3	16
Cefalotina	7	43.7	9	56.3	16
Ácido Nalidíxico	3	18.7	13	81.3	16
Tetraciclina	1	6.3	15	93.7	16

As Figuras 3 e 4 mostram a eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produto de PCR, onde é possível observar amostras positivas para os genes *eae* e *stx2*, respectivamente.

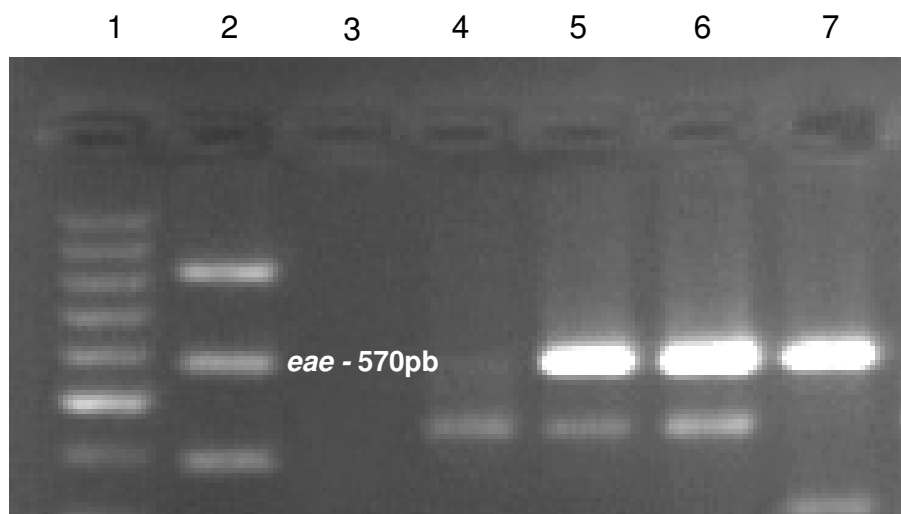


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene *eae*.

Canaleta 1 - marcador de peso molecular 100pb (Fermentas)  
 Canaleta 2 - controle positivo para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*  
 Canaleta 3 - controle negativo      Canaleta 4 - amostra 5R (negativa)  
 Canaleta 5 - amostra 1R (positiva)      Canaleta 6 - amostra 7C (positiva)  
 Canaleta 7 - amostra 13R (positiva)

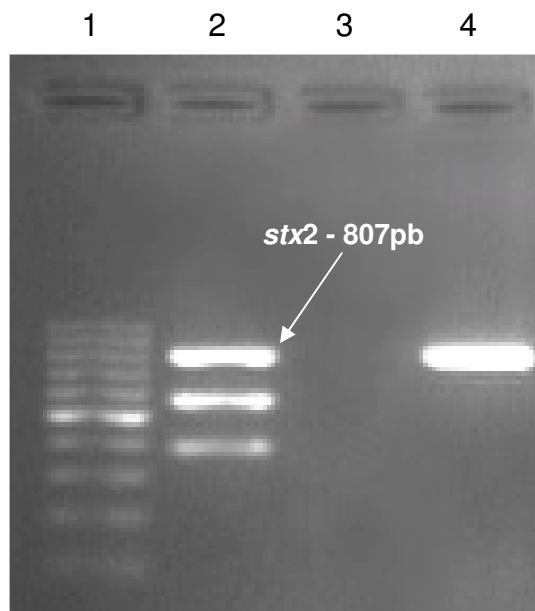


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene *stx2*

Canaleta 1 – marcador de peso molecular 100pb (Fermentas)  
 Canaleta 2 – controle positivo para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*  
 Canaleta 3 – controle negativo  
 Canaleta 4 – amostra 36C (positiva)

## VI. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas estirpes de *E. coli* isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos no noroeste do Estado de São Paulo para se determinar a frequência, analisar características genóticas, pesquisar genes de virulência de isolados de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) e caracterizar o perfil de resistência à diferentes drogas antimicrobianas. Foi observada, através da PCR de triagem, uma frequência de 20,2% em relação ao total de amostras estudadas para o gene *eae*, 9,3% para *stx2*, 2,5% para *stx2* e *eae* juntos e nenhuma para *stx1*, entretanto, do total de amostras examinadas foram isoladas uma (0,2%) estirpe possuindo o gene *stx2* e 15 (3,4%) estirpes possuindo o gene *eae*.

STEC tem sido descrita em vários países, sendo que alguns autores relatam frequências maiores e outros menores que as obtidas neste trabalho. A frequência de STEC (0,2%) foi semelhante à encontrada em Hong Kong, onde 2,1% e 0,2% de shigatoxina estavam presentes em amostras de fezes e carcaças suínas, respectivamente (LEUNG et al., 2001) e próxima ao resultado de LINDBLAD et al. (2007) que encontraram 1,0% de amostras com STEC em carcaças de suínos na Suécia, enquanto OPORTO et al. (2008) não obtiveram amostra positiva para STEC em fezes suínas na Espanha.

A frequência de STEC encontrada no presente trabalho foi bem mais baixa do que os 8,0% obtidos na Espanha por SÁNCHEZ et al. (2010) em fezes de porcos do mato e que os 6,0% encontrados por FRATAMICO et al. (2004) em fezes de suínos saudáveis nos Estados Unidos. Também na Coreia do Sul, linhagens de STEC foram identificadas em 30,0% de leitões com diarreia (KIM et al., 2010). Esses dados sugerem que STEC pode estar em maior concentração na microbiota de suínos com diarreia do que em suínos saudáveis. Pesquisa realizada em um zoológico na Argentina encontrou uma frequência para STEC de 50,8% em fezes de mamíferos selvagens, demonstrando que não apenas animais domésticos são portadores desse tipo de *E. coli* (LEOTTA et al., 2006).

Assim como estudos realizados na França, Bélgica e Irlanda em carcaças suínas, esse trabalho não isolou nenhuma amostra positiva para o sorotipo O157:H7 (BOUVET et al., 2001; BOTTELDOORN et al., 2003; LENAHAN et al., 2008), enquanto JOHNSEN et al. (2001) encontraram prevalência de apenas 0,1% para esse sorotipo em conteúdo intestinal de porcos na Noruega. BOTTELDOORN et al. (2003), sugeriram que a população de STEC deve ser menor em relação aos outros componentes da microbiota dos suínos, por isso a dificuldade em recuperar essas estirpes.

Obteve-se frequência de 3,4% dos isolados positivos para EPEC no presente trabalho, resultado semelhante ao de VU-KHAC et al. (2007) que encontrou 3,0% de EPEC em leitões com diarreia na Eslováquia, porém, mais alta que a frequência encontrada na Dinamarca, onde 1,4% dos isolados de conteúdo intestinal de porcos foram positivos para esse patótipo (FRYDENDAHL et al., 2002) e bem mais baixa que os 14,0% encontrados por MALIK et al. (2006) na Hungria em porcos sem diarreia. Essa variação na frequência pode ser devido ao tipo de manejo dos animais e à localização geográfica. Diversos trabalhos em diferentes países vêm mostrando que EPECa está significativamente associada a surtos diarreicos (YATSUNAGI et al., 2002; JENKINS et al., 2003). Tal prevalência tem sido um argumento bastante consistente para se considerar EPECa como um patógeno emergente, capaz de colonizar a mucosa intestinal e causar diarreia (SCALETSKY et al., 2002; TRABULSI et al., 2002; FRANZOLIN et al., 2005).

Muitos estudos isolaram STEC e EPEC de suínos (FRATAMICO et al., 2004; MALIK et al., 2006; VU-KHAC et al., 2007; KIM et al., 2010) mostrando que podem ter um possível papel na transmissão desses enteropatógenos, por exemplo, na contaminação cruzada, do suíno para outros animais e da carne de porco para outras carnes.

Os perfis genéticos *eae* + *lpfA*<sub>O113</sub> e *eae* + *toxB* + *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> + *ehxA* foram encontrados tanto em amostras de fezes quanto de carcaças, isso sugere que pode ter ocorrido uma contaminação fecal das carcaças. Amostras de carcaças suínas analisadas em um abatedouro na Suíça mostraram a presença dos genes *eae* e *ehxA* em 10,0% e 3,0% das amostras pesquisadas, respectivamente (KAUFMANN et al.,

2006), enquanto neste trabalho foram encontrados 3,4% de positividade para *eae* e 0,4% para *ehxA*. ISLAM et al. (2008) estudando amostras de búfalo, bovino e caprino obtiveram 12,7% de amostras positivas para o gene *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, enquanto neste estudo a porcentagem foi de 0,4%. Contrariamente TATARCZAK et al. (2005) não encontraram amostras de suínos positivas para esse gene.

O gene *lpfA*<sub>O113</sub> foi encontrado em 1,6% das amostras deste trabalho, o que não corrobora com outros autores, como OSEK et al. (2003) e TATARCZAK et al. (2005) que identificaram a presença de *lpfA*<sub>O113</sub> em 100,0% e 61,0% das amostras de suínos, respectivamente, ISLAM et al. (2008) que obtiveram 35,2% de amostras de búfalo e bovino positivas para *lpfA*<sub>O113</sub> e LEOTTA et al. (2006), que encontraram todas STEC positivas para esse gene em animais de um zoológico. Esses achados estão acima dos valores verificados neste estudo e sugerem que *LPF*<sub>O113</sub> desempenha um papel na colonização do hospedeiro suíno, embora isso necessite ser mostrado experimentalmente (OSEK et al., 2003).

Assim como neste trabalho, TATARCZAK et al. (2005) não obtiveram amostra de suíno positiva para os genes *stx1*, *efa1* e *saa*. Em Bangladesh, ISLAM et al. (2008) pesquisando *E. coli* em búfalo, bovino e caprino também não obtiveram positividade para os genes *iha* e *efa1* e LEOTTA et al. (2006), na Argentina, relataram que todos os isolados de animais de um zoológico foram negativos para os genes *saa*, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub> e *efa1*. Ao contrário deste trabalho, OSEK et al. (2006) não obtiveram nenhuma amostra de suíno positiva para *toxB*. Entretanto, quanto ao gene *bfp* nenhuma estirpe foi positiva o que concorda com o relatado por KRAUSE et al. (2005) na Alemanha que também não encontraram esse mesmo gene em suínos.

O gene *ehxA*, foi encontrado em *E. coli* de humano com diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (COOKSON et al., 2007; PRADEL et al., 2008) e o gene *lpfA*<sub>O113</sub> foi associado a EPECa causadora de diarreia em humanos (AFSET et al., 2006) e a presença desses genes nos isolados de suínos pode possivelmente apresentar potencial zoonótico.

Dentre os isolados analisados, todos apresentaram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados e 75,0% apresentaram resistência a mais de três.

A multirresistência tem sido citada por diversos autores (BACCARO et al., 2002; GUERRA et al., 2003) apresentando níveis mais elevados em cepas isoladas de suínos quando comparada a bovinos e ovelhas, fato que se deve à pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, provavelmente na ração animal como promotor de crescimento (ENNE et al., 2008). Esta resistência é preocupante, pois pode potencialmente se espalhar para humanos, tanto através da colonização direta do intestino humano por cepas de *E. coli* animal quanto pela transmissão de genes de resistência a bactérias residentes no intestino humano.

O maior índice de sensibilidade foi observado para nitrofurantoína, em 100,0% dos isolados, seguido por ciprofloxacina com 93,7%, entretanto se comparado ao ácido nalidíxico, que pertence também ao grupo das quinolonas, o resultado foi discrepante, com somente 18,7% dos isolados sensíveis. O trabalho realizado por FRANCO et al. (2010) em carcaças suínas obteve porcentagem semelhante ao do presente estudo em relação à sensibilidade dos isolados à ciprofloxacina, com 88,2 %, porém houve diferença em relação a nitrofurantoína, onde apenas 17,6% dos isolados foram sensíveis. A divergência observada pode ser atribuída à variabilidade das estirpes e ao crescente aumento da resistência antimicrobiana entre as enterobactérias (COSTA et al., 2006). O antimicrobiano sulfametoxazol+trimetoprim teve 87,5% dos isolados sensíveis a ele, resultado semelhante ao de VARGA et al. (2008), que encontraram 93,6% dos isolados de *E. coli* de suínos saudáveis sensíveis ao mesmo.

A maior resistência dos isolados foi observada para tetraciclina com 93,7%. Isto não é surpreendente, uma vez que a tetraciclina é usada há muitos anos como promotor de crescimento para animais, e seu uso generalizado provavelmente contribuiu para as altas taxas de resistência (ROBERTS, 1996). Resultado semelhante foi observado por LIM et al. (2007) que encontraram 96,3% dos isolados de *E. coli* de suínos saudáveis resistentes a tetraciclina. Também, KOZAK et al. (2009) e VARGA et al. (2008) obtiveram 83,0% e 78,9% dos isolados de suínos saudáveis resistentes a tetraciclina, respectivamente, e FRANCO et al. (2010), obtiveram resistência um pouco mais baixa, com 70,6% dos isolados de carcaça suína resistentes a esse antibiótico.

Ácido nalidíxico foi o antimicrobiano com a segunda maior resistência, 81,3%, o que diverge do resultado encontrado por KOSAK et al. (2009), que não encontrou nenhum isolado de *E. coli* proveniente de suínos resistente a ele. Vários estudos sugeriram que o uso do ácido nalidíxico seleciona para a resistência à droga e seus derivados, ou seja, as quinolonas e tem-se especulado que o uso veterinário de fluoroquinilonas pode levar a um aumento na resistência entre os patógenos humanos (HIRAI et al., 1986; YOSHIDA et al., 1990).

Os resultados mostraram que amostras provenientes de suínos da região de Ribeirão Preto-SP apresentaram *E. coli* que contêm genes de virulência associados a STEC e EPEC. Esse fato é um alerta para que esses animais sejam monitorados, pois podem ser potenciais reservatórios de STEC e EPEC causadoras de doenças em humanos.

## VII. CONCLUSÕES

1. A frequência de STEC foi de 0,2% e EPEC foi de 3,4%, isoladas de fezes e carcaças de suínos abatidos na região de Ribeirão Preto - SP.
2. Os genes de virulência *stx1*, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *saa*, *efa1*, *iha* e *bfp* não foram encontrados nas estirpes analisadas através do teste de PCR.
3. As estirpes de *E. coli* isoladas não foram sorotipadas com os anti-sorogrupos da bateria utilizada.
4. As estirpes de STEC e EPEC estudadas apresentaram genes de virulência que estão relacionados a graves doenças no homem.
5. As estirpes de *E. coli* testadas pelo teste de suscetibilidade mostraram maior sensibilidade aos antimicrobianos nitrofurantoína e ciprofloxacina e apresentaram alta multirresistência.



## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of Virulence Genes Linked with Diarrhea Due to Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA Microarray Analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.10, p. 3703–3711, 2006.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarréia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.

BAUER, M. E.; WELCH, R. A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 167-175, 1996.

BAUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpf*ABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*, **Journal Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2087-2097, 1995.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2483-2488, 1993.

BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRIKX, M.; RIJPENS, N.; HERMAN, L. Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 97-104, 2003.

BOUVET, J.; BAVAI, C.; ROSSEL, R.; LE ROUX, A.; MOONTET, M. P.; RAYGUENIOT, S.; MAZUY, C.; ARQUILLIERE, C.; VERNZOY-ROZAND, C. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2-3, p. 249-255, 2001.

CALDERWOOD, S. B.; ACHESON, D. W. K.; KEUCSH, G. T.; BARRETT, T. J.; GRIFFIN, P. M.; STROCKBINE, N. A.; SWAMINATHAN, B.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; KAPLAN, B. S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A. D.; OBRIG, T. G.; TAKEDA, Y.; TARR, P. I.; WACHSMUTH, I. K. Proposed new nomenclature for Shiga like toxin (verotoxin) family. **ASM News**, v. 62, p. 118-119, 1996.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S15**. Wayne: NCCLS, 2005. 117p.

COOKSON A. L.; BENNETT J.; THOMSON-CARTER F.; ATTWOOD G. T. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6360-6369, 2007.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINSBROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6761-6769, 2002.

ENDO, Y.; TSURUGI, K.; YUTSUDO, T.; TAKEDA, Y.; OGASAWARA, T.; IGARASHI, K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 171, n. 1-2, p. 45-50, 1988.

ENNE, V. I.; CASSAR, C.; SPRIGINGS, K.; WOODWARD, M. J.; BENNETT, P. M. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 2, p. 193-199, 2008.

FAGUNDES-NETO, U. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants: clinical aspects and small bowel morphological alterations. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 117-119, 1996.

FRANCO, R. M.; MANTILLA S. P. S.; GOUVÊA R.; OLIVEIRA, L. A. T. Resistência Antimicrobiana de *Escherichia coli* Isoladas de Carne e Dejetos Suínos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

FRATAMICO, P. M.; BAGI, L. K.; BUSH, E. J.; SOLOW, B.T. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7173-7178, 2004.

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 169-182, 2002.

GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B. C.; IRINO, K.; GOMES, T. A. T. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1297-1298, 2006.

GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; LEHMANN, S.; HELMUTH, R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, v. 3, p. 489-492, 2003.

GYLES, C. L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994, p.3-72.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HIRAI, K.; AOYAMA, H.; SUZUE, S.; IRIKURA, T.; IYOBE, S.; MITSUHASHI, S. Isolation and characterization of norfloxacin resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 2, p. 248-253, 1986.

ISLAM, M. A.; MONDOL, A. S.; DE BOER, E.; BEUMER, R. R.; ZWIETERING, M. H.; TALUKDER, K. A.; HEUVELINK, A. E. Prevalence and genetic characterization of shiga toxinproducing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5414-5421, 2008.

JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K.; NEWLAND, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiology Letters**, v. 44, n. 1, p. 109-114, 1987.

JENKINS, C.; SMITH, H. R.; LAWSON, A. J.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J. G.; TOMPKINS, D. S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Echerichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2003.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JOHNSEN, G.; WASTESON, Y.; HEIR, E.; BERGET, O.I.; HERIKSTAD, H. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 193-200, 2001.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p.123-140, 2004.

KARMALI, M. A.; PETRIC, C.; LIM, P. C.; FLEMING, P. C.; STEELE, B. T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. **The Lancet**, v. 2, n. 8362, p. 1299-1300, 1983.

KAUFMANN, M.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Fecal Samples of Finished Pigs at Slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 2, p. 260-266, 2006.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, n. 4, p. 151-156, 2001.

KIM, Y. J.; KIM, J. H.; HUR, J.; LEE, J. H. Isolation of *Escherichia coli* from piglets in South Korea with diarrhea and characteristics of the virulence genes. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 1, p. 59-64, 2010.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

KOZAK, G. K.; BOERLIN P.; JANECKO N.; REID-SMITH R.; JARDINE C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 559-566, 2009.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1-2, p. 87-95, 2005.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

LENAHAN, M.; CROWLEY H.; O'BRIEN, S. B; BYRNE, C.; SWEENEY, T.; SHERIDAN, J. J. The potential use of chilling to control the growth of Enterobacteriaceae on porcine carcasses and the incidence of *E. coli* O157:H7 in pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1512-1520, 2008.

LEOTTA, G.A.; DEZA, N.; ORIGLIA, J.; TOMA, C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E., IYODA, S.; SOSA-ESTANI, S.; RIVAS, M. Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1-2, p. 151-157, 2006.

LEUNG, P. H. M., YAM, W. C., NG, W. W. S. AND PEIRIS, J. S. M. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. **Epidemiology and Infection**, v. 126, n. 2, p. 173-179, 2001.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**, v. 6, n. 1, p. 31-51, 1984.

LICENCE, K.; OATES, K. R.; SYNGE, B. A.; REID, T. M. An outbreak of *E.coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiology and Infection**, v. 126, n. 1, p. 135-138, 2001.

LIM S. K.; LEE H. S.; NAM H. M.; CHO Y. S.; KIM J. M.; SONG S. W.; PARK Y. H.; JUNG S. C. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 283-286, 2007.

LINDBLAD, M.; LINDMARK, H.; LAMBERTZ, S. THISTED.; LINDQVIST, R. Microbiological Baseline Study of Swine Carcasses at Swedish Slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1790-1797, 2007.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1332-1344, 2005.

MALIK, A.; TÓTH, I.; BEUTIN, L.; SCHMIDT, H.; TAMINIAU, B.; DOW. M. A.; MARABITO, S.; OSWALD, E.; MAINIL J.; NAGY, B. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae+* *Escherichia coli* from weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 1-2, p. 82-93, 2006.

MANTILLA S. P. S.; FRANCO R. M.; OLIVEIRA L. A. T.; SANTOS E. B.; GOUVÊA R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp isoladas de carne moída bovina . **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens.



**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; TAKAYA, S.; SAKAI, N.; MIYAZAKI, M.; ONO, A.; YANAGAWA, H. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **American Journal of Epidemiology**, v. 150, n. 8, p. 797-803, 1999.

MILLER, V. L.; KAPER, J. B.; PORTNOY, D. A.; ISBERG, R. R. **Molecular genetics of bacterial pathogenesis**. Washington: ASM Press, 1994. 529 p.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 793-806, 2005.

NAKAO, H.; KIMURA, K.; MURAKAMI, H.; MARUYAMA, T.; TAKEDA, T. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Japan. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 289-297, 2002.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. Document M2-A8**. Wayne, PA: NCCLS, 2003. 58 p.

NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of

enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 275-288, 2000.

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 146, n. 6, p. 763-769, 1982.

O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W.; FORMAL, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with hemorrhagic colits in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **The Lancet**, v. 321, n. 8326, p. 702, 1983.

OPORTO, B.; ESTEBAN, J. I.; ADURIZ, G.; JUSTE, R. A.; HURTADO, A. *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in northern Spain. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 2, p. 73-81, 2008.

OSEK, J. Identification of the subtilase cytotoxin gene among Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Bulletin Veterinary Institute Pulawy**, v. 50, p. 29-33, 2006.

OSEK, J.; WEINER, M.; HARTLAND, E. L. Prevalence of the *lptO*113 gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 259-266, 2003.

PATON, A. W.; BEUTIN, L.; PATON, J. C. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. **Gene**, v. 153, n. 1, p. 71-74, 1995.

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999-7009, 2001.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 271-274, 2002.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Belonging to serogroups O111, O157 and O113 by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3362-3365, 1999.

PATON, A. W.; WOODROW, M. C.; DOYLE, R. M.; LANSER, J. A.; PATON, J. C. Molecular characterization of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3357-61, 1999.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PRADEL, N.; BERTIN, Y.; MARTIN, C.; LIVRELLI, V. Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome patients and dairy samples in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2118-2128, 2008.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.;

BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colits associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England of Journal Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

Roberts, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 1–24, 1996.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, A.; VIDAL, D.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; HERRERA-LEÓN, S.; ALONSO, J. M.; REY, J. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2-4, p. 420-423, 2010.

SCALETSKY, I. A.; FABBRICOTTI, S. M.; SILVA, S. O. C.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-Adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p. 855-58, 2002.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W.-L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6863-6873, 2001.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H.; KERNBACH, C.; KARCH, H. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology**, v. 142, n. 4, p. 907-914, 1994.

STELLA, A. E.; RIGOBELLO, E. C.; OLIVEIRA, A. C.; MALUTA, R. P.; MARIN, J. M.; ÁVILA, F. A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, p. 66-74, 2008.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÈRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence of bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 653-658, 2002.

TARR, C. L.; LARGE, T. M.; MOELLER, C. L.; LACHER, D. W.; TARR, P. I.; ACHESON, D. W.; WHITTAM T. S. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6853-6859, 2002.

TARR, P. I.; BILGE, S. S.; VARY, J. C.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WARD, T. R.; BAYLOR, M. R.; BESSER, T. E. Iha: A novel *Escherichia coli* O157:H7 adherenceconferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1400-1407, 2000.

TARR, P. I.; GORDON, C. A.; CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9464, p.1073-1086, 2005.

TATARCZAK, M.; WIECZOREK, K.; POSSE, B.; OSEK, J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 1-2, p. 77-85, 2005.

TATSUNO I.; HORIE, M.; ABE, H.; MIKI, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; TAGUCHI, H.; KAMIYA, S.; HAYASHI, T.; SASAKAWA, C. *toxB* Gene on pO157 of

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6660-6669, 2001.

TESH, V. I.; O'BRIAN, A. D. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga like toxins. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1817-1822, 1991.

TOMA, C.; ESPINOSA, E. M.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4937-4946, 2004.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-13, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**, 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.

VARGA, C.; RAJIĆ, A.; MCFALL, M. E.; AVERY, B. P.; REID-SMITH, R. J.; DECKERT, A.; CHECKLEY, S.L.; MCEWEN S.A. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolated from swine fecal samples in 90 Alberta finishing farms. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 2, p. 175-80, 2008.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1787-1789, 2004.

VU-KHAC, H.; HOLODA, E.; PILIPCINEC, E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; LÓPEZ, C.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes,

intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 176-187, 2007.

YATSUNAGI, J.; SAITO, S.; SATO, H.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrhea outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 294-297, 2002.

YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, S. Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 8, p.1271-2, 1990.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1441-6, 2002.