

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

***Escherichia coli* POTENCIALMENTE PATOGÊNICA
ISOLADAS DE OVINOS SAUDÁVEIS CRIADOS
EXTENSIVAMENTE E DE CARÇAÇAS EM MATADOUROS-
FRIGORÍFICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Renato Pariz Maluta

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

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

JABOTICABAL – SP - BRASIL
Janeiro de 2012

M261e Maluta, Renato Pariz
Escherichia coli potencialmente patogênica isoladas de ovinos saudáveis criados extensivamente e de carcaças em matadouros-frigoríficos no Estado de São Paulo / Renato Pariz Maluta. – Jaboticabal, 2012
ix, 81 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Fernando Antonio de Ávila
Banca examinadora: Beatriz Ernestina Cabilio Guth, Ariel Eurides Stella, Hélio José Montassier, José Moacir Marin
Bibliografia

1. STEC. 2. EPEC. 3. Stx2e. 4. Fazendas. 5. Matadouros. 6. Ovinos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8.636.3

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

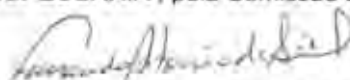
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: *Escherichia coli* POTENCIALMENTE PATOGÊNICA ISOLADAS DE OVINOS SAUDÁVEIS CRIADOS EXTENSIVAMENTE E DE CARÇAÇAS EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO


AUTOR: RENATO PARIZ MALUTA

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

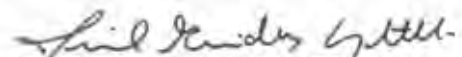
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:




Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



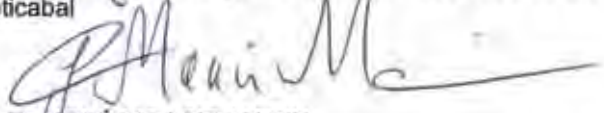
Profa. Dra. BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia Universidade Federal de São Paulo / São Paulo/SP



Prof. Dr. ARIEL EURIDES STELLA
Universidade Federal de Goiás / Jatal/GO



Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN
Departamento de Ciências Morfológicas / Faculdade de Odontologia - USP / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 31 de janeiro de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATO PARIZ MALUTA – nascido a 27 de junho de 1981 em São Caetano do Sul – SP. Iniciou o curso de Medicina Veterinária em março de 2001 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), concluindo em janeiro de 2006. Em março de 2006 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, concluindo em fevereiro de 2008. Em março de 2008 iniciou o curso de doutorado no mesmo Programa.

“NON DVCOR DVCO”
“Não Sou Conduzido, Conduzo”

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, amigos, professores e todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho. Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila os anos de convívio e a experiência a mim transmitida.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao “Canadian Bureau for International Education” (CBIE) pelas bolsas de estudo concedidas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
III. OBJETIVOS.....	11
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
V. RESULTADOS.....	25
VI. DISCUSSÃO.....	56
VII. CONCLUSÕES.....	65
VIII. REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- aEPEC → EPEC atípica
BD → Diarréia sanguinolenta
BGB → Caldo verde brilhante
CLSI → “Clinical and Laboratory Standards Institute”
EAF → plasmídeo “EPEC Adherence Factor”
EPEC → *Escherichia coli* enteropatogênica
ETEC → *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC → *Escherichia coli* extra-intestinal
HC → Hibridização de colônias
HUS → Síndrome urêmico-hemolítica
LEE → “Locus of enterocyte effacement”
MA → Agar MacConkey
PAI → Ilha de patogenicidade
PCR → Reação em cadeia de polimerase
PFGE → Eletroforese em Campo Pulsado
PT → “Pulsetype”
STEC → *Escherichia coli* Shigatoxigênica
tEPEC → EPEC típica
UPGMA → “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

***Escherichia coli* POTENCIALMENTE PATOGÊNICA ISOLADAS DE OVINOS SAUDÁVEIS CRIADOS EXTENSIVAMENTE E DE CARÇAÇAS EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

RESUMO – Os ruminantes são reservatórios de cepas de *Escherichia coli* envolvidas na etiologia de doenças graves em humanos. Nesse estudo, a frequência de *E. coli* Shigatoxigênica (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) foi determinada em fezes e carcaças de ovinos em três fazendas e um matadouro-frigorífico localizados no Estado de São Paulo e as cepas encontradas foram caracterizadas. A frequência de STEC nas três fazendas foi similar, enquanto a frequência de EPEC foi variável. Não foram encontradas amostras contendo ETEC. As cepas de STEC *stx1*- *stx2*+ revelaram-se geneticamente heterogêneas, possuindo frequentemente as variantes Stx2a ou Stx2_{dact}, as quais são relacionadas à doenças mais severas em humanos e ademais eles foram frequentemente originados de amostras colhidas do matadouro-frigorífico. Adicionalmente, algumas cepas desse grupo possuíram novas variantes de Stx2 ou o subtipo Stx2e, que é relacionado à doença do edema em suínos. As cepas de STEC *stx1*+ *stx2*+ e *stx1*+ *stx2*- mostraram-se geneticamente mais homogêneas, a maioria possuindo os genes *lpfA*_{O113}, *iha* e *ehxA*. As cepas de STEC *stx1*+ *stx2*- apresentaram comumente o gene relacionado à ExPEC *tsh*. As estirpes de EPEC foram heterogêneas, muitas possuíram os genes *efa1*, *ehxA*, *lpfA*_{O113} ou *paa*, que são associados à diarreia em humanos. As cepas de STEC e EPEC demonstraram-se geneticamente diversas quando analisadas por PFGE. Esses resultados demonstram que cepas de *E. coli* potencialmente patogênica para humanos estão presentes na microbiota intestinal de ovinos, com potencial de contaminar carcaças em abatedouro e conseqüentemente serem transmitidas por via alimentar.

Palavras-Chave: STEC, EPEC, Stx2e, fazendas, matadouros, ovinos

**POTENTIALLY PATHOGENIC *Escherichia coli* IN HEALTHY PASTURE-
RAISED SHEEP ON-FARM AND CARCASSES AT THE ABATTOIR IN THE
SÃO PAULO STATE, BRAZIL**

SUMMARY – Ruminants are a reservoir of *Escherichia coli* which may cause severe disease in humans. Pathotypes related to intestinal disease include Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). In this study, the prevalence of these pathotypes was examined in sheep feces and carcasses on three farms and at an abattoir. The strains were then characterized. The prevalence of STEC on the three farms was similar, whereas that of EPEC varied between farms. No ETEC were detected. STEC *stx1*- *stx2*+ strains were genetically heterogeneous, more frequently possessing Stx2 variant Stx2a or Stx2_{dact} related to more severe disease in humans, and often originated from the abattoir rather than the farms. In addition, some strains of this group possessed new Stx2 variants or Stx2e, the subtype related to porcine edema disease. STEC *stx1*+ *stx2*+ and *stx1*+ *stx2*- strains were genetically more homogeneous, mostly possessed the genes *lpfA*_{O113}, *iha* and *ehxA*. The STEC strains *stx1*+ *stx2*- commonly harbored ExPEC-related gene *tsh*. The EPEC strains were heterogeneous, several possessing *efa1*, *ehxA*, *lpfA*_{O113} or *paa*, genes associated with diarrhea in humans. STEC and EPEC strains were genotypically diverse by PFGE. These results demonstrate that *E. coli* potentially pathogenic for humans are present in the sheep intestinal microflora, particularly at the abattoir, underlining the potential for foodborne transmission.

Keywords: STEC, EPEC, Stx2e, farms, abattoir, sheep

I. INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* é um habitante da microbiota intestinal dos mamíferos. Algumas cepas com certa plasticidade genética podem pertencer a patótipos relacionados a doenças tanto em animais quanto em humanos. Dentre esses patótipos se destacam três que são associados à diarreia, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Shigatoxigênica (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC).

Os ruminantes domésticos, especialmente bovinos e ovinos, têm sido considerados os principais reservatórios de STEC causadoras de infecções em humanos. A transmissão ocorre através do consumo de alimentos mal cozidos, produtos lácteos não pasteurizados, água ou vegetais contaminados por fezes contendo cepas de STEC. Algumas cepas de *E. coli* patogênicas a humanos fazem parte da microbiota intestinal desses animais. Recentemente algumas cepas de aEPEC (EPEC atípica) com certos genes de virulência foram associadas à diarreia em humanos. A possibilidade de animais servirem como reservatório de aEPEC com potencial zoonótico ainda precisa ser mais bem detalhada.

A importância econômica da ovinocultura no Estado de São Paulo tem crescido muito, assim como o fornecimento de carne para consumo da população. Embora já existam estudos mostrando a presença de STEC e aEPEC em ovinos, estudos adicionais podem reforçar a possibilidade desses animais atuarem como reservatórios de *E. coli* patogênica. Um estudo com objetivo de detectar alguns patótipos de *E. coli* e caracterizá-los profundamente pode contribuir para se entender melhor esse fenômeno.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A bactéria *Escherichia coli* é um microrganismo Gram-negativo. Essa espécie pertence à família *Enterobacteriaceae* e ao gênero *Escherichia*, o qual além de *E. coli*, contém as espécies *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* e *E. blattae*. As espécies desse gênero são oxidase negativas. A lactose é fermentada pela maioria das cepas de *E. coli*, mas essa fermentação pode ser lenta ou ausente nas outras espécies do gênero. Em relação à morfologia, as bactérias desse gênero se apresentam como bastonetes (bacilos) com extremidades arredondadas e que têm de 1,1 a 1,5 µm de diâmetro e de 2,0 a 6,0 µm de comprimento. Elas se apresentam de forma individual ou em pares e podem ser móveis por possuírem flagelos peritríqueos ou imóveis (SCHEUTZ & STROCKBINE, 2005).

E. coli pertence a um grupo geneticamente heterogêneo no qual seus membros são geralmente não patogênicos (GYLES, 2007). O nicho das cepas comensais é a camada mucosa do cólon dos mamíferos (KAPER et al., 2004). Existem alguns clones altamente adaptados de *E. coli* que adquiriram certas características de virulência as quais lhe conferem uma capacidade aumentada em se adaptar a novos nichos e causar uma ampla gama de enfermidades (KAPER et al., 2004), tornando-se assim patogênicos. Devido à aquisição de ilhas de patogenicidade e outros elementos genéticos móveis, os genomas das cepas de *E. coli* patogênicas podem ser até 10 Mb maiores do que os genomas daquelas comensais. Os genomas das cepas patogênicas podem apresentar aproximadamente 5000 genes (SCHMIDT, 2010).

Como as diferentes cepas de *E. coli* patogênicas podem causar variadas lesões, o conjunto de fatores de virulência associados a determinada lesão é muito útil para fins de classificação. Embora seja possível determinar a presença desses fatores por técnicas fenotípicas (como efeitos em cultura celular, produção de hemólise, etc.), atualmente é muito mais comum determiná-los através da presença dos seus genes por técnicas como reação em cadeia de polimerase (PCR) e hibridização de colônias (HC).

Essas técnicas permitem que um número maior de amostras e genes sejam testados ao mesmo tempo.

Em geral, cepas que apresentam o mesmo conjunto de fatores de virulência e causam lesões semelhantes são classificadas como pertencentes ao mesmo patótipo (KAPER et al., 2004). Essa classificação não é consensual, pois SCHMIDT (2010) considera que cepas que apresentam essas características devem ser classificadas como pertencentes ao mesmo patovar. Entretanto, para ambos os autores acima citados, os patótipos tendem a ser grupos clonais que compartilham o mesmo antígeno O, o qual é determinado pela cadeia do oligossacarídeo terminal externo encontrado na parede celular, e o mesmo antígeno H, que é determinado pela proteína flagelar. Algumas cepas também apresentam antígeno capsular K. A denominação dos antígenos vem do idioma alemão, nesse idioma a característica de não apresentar motilidade foi denominada “ohne Hauch” (sem véu/filme) e por isso o antígeno relacionado a essa característica foi chamado de “O”. Seguindo a mesma lógica, o antígeno ligado à motilidade foi denominado “H” (“Hauch” – véu/filme). O antígeno K é associado à presença de cápsula, em alemão “Kapsel”.

Um sorogrupo é uma variedade antigenicamente distinta dentro de uma espécie bacteriana baseada somente no antígeno O enquanto um sorotipo é essa variedade baseada nos antígenos O, H e algumas vezes no antígeno K (KAPER et al., 2004).

Os diferentes patótipos de *E. coli* que causam doenças em seres humanos são classicamente distribuídos em dois grupos principais, *E. coli* que causa diarreia DEC (Diarrhoeagenic *E. coli*) e *E. coli* que causa infecções extraintestinais ExPEC (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*). As infecções extraintestinais acometem o trato urinário, o sistema nervoso central, o sistema circulatório e o sistema respiratório (RUSSO & JOHNSON, 2000). Os patótipos de ExPEC associados a infecções de trato urinário (ITU) e meningite neonatal são conhecidos como UPEC (uropathogenic *E. coli*) e NMEC (meningitis-associated *E. coli*) respectivamente. As ExPEC podem apresentar diversos genes de virulência. Por exemplo, um estudo com UPEC e NMEC de seres humanos, encontrou dentre outros, o gene do fator necrosante citotóxico (*cnf*) e o gene da fímbria P (*papC*) em mais de 20% e 50% das amostras, respectivamente (EWERS et

al., 2007). As ExPEC encontradas em animais também podem apresentar vários genes de virulência. Em um trabalho realizado no Brasil com cadelas apresentando piometra, encontrou-se o gene da fimbria S (*sfa*) e aerobactina (*iuc*) em respectivamente mais de 70% e 30% dos isolados identificados como *E. coli* (COGGAN et al., 2008). Um patótipo de ExPEC conhecido como APEC (Avian pathogenic *E. coli*) está relacionado à infecções respiratórias, pericardite e septicemia em aves (KAPER et al., 2004).

As DEC são geralmente divididas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* Shigatoxigênica (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difuso-aderente (DAEC). SCHMIDT (2010) considera que as EPEC atípicas (que serão descritas com mais profundidade no decorrer desse trabalho) são um patótipo a parte e não uma subdivisão de EPEC. Em animais existe uma terminologia diferente. Por exemplo, alguns autores denominam as EPEC isoladas de suínos e coelhos respectivamente PEPEC (porcine enteropathogenic *E. coli*) e REPEC (rabbit enteropathogenic *E. coli*) (TAKEUCHI et al., 1978; AN et al., 2000; BRUANT et al., 2009).

EPEC é um agente relacionado a casos de diarreia infantil em países em desenvolvimento e pode ser definida pela produção de lesões do tipo “attaching and effacing” (A/E) e pela ausência de toxina de Shiga (Stx) (TRABULSI et al., 2002; KAPER et al., 2004). Para a produção de A/E, a bactéria se liga ao epitélio intestinal e causa mudanças no citoesqueleto, incluindo o acúmulo de actina polimerizada. A microvilosidade do intestino é danificada e surgem lesões em forma de pedestal (KAPER et al., 2004). A capacidade de induzir A/E é codificada por genes cromossomais localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI) denominada “locus of enterocyte effacement (LEE)”. Dentre outros genes, essa PAI contém *eae*, o qual codifica uma proteína externa à membrana chamada intimina, que media a ligação de EPEC às células epiteliais. A intimina também estimula resposta imune dos linfócitos Th1 e a hiperplasia das criptas intestinais (HIGGINS et al., 1999). Além de *eae*, LEE contém os genes que codificam um sistema de secreção do tipo III (T3SS) e proteínas

efetoras. Uma dessas proteínas, a qual é denominada Tir (translocated intimin receptor) se liga a célula do hospedeiro se tornando um receptor para a intimina (KAPER et al., 2004).

O patótipo EPEC é comumente subdividido em dois grupos, EPEC típica (tEPEC – contendo o plasmídio EAF - EPEC adherence factor) e EPEC atípica (aEPEC – não contém EAF) (TRABULSI et al., 2002). As cepas de aEPEC também podem ser denominadas de ATEC (SCHMIDT, 2010). O plasmídio EAF é responsável pela aderência localizada em cultura de células epiteliais mediado pelo gene *bfp* e seu produto BFP (Bundle Forming Pilus). A maioria das tEPEC pertence aos sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O126, O127, O128, O142 e O158 (KAPER, 1996).

Além da ausência do plasmídio EAF, as aEPEC por definição não apresentam regulação plasmidial dos fatores dependentes de T3SS, o que gera um fenótipo de aderência diferente das tEPEC (SCHMIDT, 2010). As aEPEC são heterogêneas, o que é refletido pela ocorrência de muitos isolados não tipáveis (TENNANT et al., 2009). Nas cepas tipáveis, os sorogrupos mais comuns são O51, O145, O26, O55 e O111 (SCHMIDT, 2010). Um estudo recente encontrou cepas de *E. coli* associados a casos de diarreia sanguinolenta e com um conjunto de fatores de virulência (incluindo *eae*) e sorotipos típicos de EHEC (ou STEC). Entretanto, esses isolados não apresentaram os genes que codificam as toxinas Stx1 ou Stx2 e, portanto, deveriam ser classificados como EPEC (BIELASZEWSKA et al., 2008). Isso levou os autores a crer que esses isolados eram de fato EHEC que perderam *stx* e, portanto estes foram denominados EHEC-LST. A já provada transdução dos genes que codificam *stx* (CORNICK et al., 2006) reforça essa possibilidade. Outro estudo recente mostra uma relação genética muito próxima entre EHEC e aEPEC isoladas de bovinos e ovinos (COOKSON et al., 2010). Baseados em seus resultado, os autores deste estudo acreditam que o patótipo aEPEC é heterogêneo e contém (i) EHEC-LST, (ii) cepas clássicas de EPEC que perderam o plasmídio EAF, (iii) cepas de aEPEC associadas com diarreia e que contém fatores de virulência de STEC e (iv) cepas comensais de aEPEC que colonizam os bovinos e ovinos e contém fatores de virulência de STEC.

O termo STEC se refere a cepas de *E. coli* que produzem uma citotoxina potente denominada Shigatoxina (Stx). Essas toxinas, que também são conhecidas como verotoxinas (VT), (GYLES, 2007), são também encontradas em fagos do tipo lambda (NATARO & KAPER, 1998). Existem dois tipos de Shigatoxina (Stx1 e Stx2) e dentro desses dois tipos há vários subtipos (Stx1, Stx1c, Stx1d, Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2d_{act}, Stx2e, Stx2f e Stx2g) (SCHEUTZ & STROCKBINE, 2005; SLANEC et al., 2009; GYLES & FAIRBROTHER, 2010). As cepas de STEC podem causar doenças em seres humanos como diarreia sanguinolenta (BD) e síndrome urêmica hemolítica (HUS). Algumas STEC também podem ser portadoras de PAIs homólogas à LEE (KAPER et al., 2004) e portanto apresentam o gene *eae* e podem causar lesões do tipo "A/E". Devido a relatos que demonstram que STEC positiva para *eae* está mais frequentemente associada a surtos de HUS do que STEC *eae* negativa (PATON & PATON, 1998; KARMALI et al., 2003) e ao fato do acrônimo EHEC ser classicamente utilizado para se denominar STEC capaz de produzir doença, existe uma tendência em se denominar STEC que apresenta LEE e conseqüentemente *eae* como EHEC. Entretanto, como existem casos de doenças causadas por cepas de STEC que não portavam LEE, essa classificação pode ser incompleta. Nesse trabalho foi considerada somente a nomenclatura STEC para todas as cepas que apresentaram *stx*, apresentando ou não *eae*.

Em seres humanos, algumas cepas de STEC além de causar as lesões tipo "A/E", podem causar lesões no endotélio renal através de atividade tóxica das Shigatoxinas. As Shigatoxinas também atuam nos enterócitos. Stx2 é mais frequentemente associada a doenças graves do que Stx1. Os sorogrupos de STEC mais associados a doenças são O26, O103, O111, O145 e O157 (SCHMIDT, 2010). Em relação à saúde animal, isolados de STEC com os virotipos (classificação baseada na presença de fatores de virulência) Eae:Stx1 e/ou Stx2 e os sorotipos O5, O8, O20, O26, O103, O111, O118 e O145 podem causar disenteria em ovinos (GYLES & FAIRBROTHER, 2010) mas em geral os ruminantes são reservatórios de STEC de forma assintomática (GYLES, 2007).

Além da produção de Shigatoxinas, a aderência ao epitélio do intestino é também importante para a patogênese de doenças causadas por STEC. Considerando que STEC que não apresenta a ilha de patogenicidade LEE também é capaz de causar doenças severas, é possível que outras adesinas que são codificadas em regiões do genoma diferentes de LEE possam contribuir com a aderência à mucosa do intestino e tenham uma função na patogênese (TOMA et al., 2004).

Em adição aos genes que definem os patótipos, as cepas de *E. coli* podem apresentar diversos outros. As adesinas putativas, por exemplo, têm sido estudadas mais recentemente em STEC. Essas adesinas ou são codificadas em regiões do genoma da *E. coli* EDL933 denominadas “O islands” (OIs) ou em plasmídios. Por exemplo, os fatores Efa1/LifA (EHEC factor for adherence), Iha (IrgA homologue adhesin) e LPF (Long polar fimbriae) são codificados em OIs enquanto Saa (STEC autoagglutinating adhesin) e ToxB (proteína com homologia às toxinas A e B de *Clostridium difficile*) são plasmidiais. O gene que codifica uma hemolisina (*ehxA*) também é encontrado em plasmídio (TOMA et al., 2004; GYLES & FAIRBROTHER, 2010), especialmente no plasmídio pO157. A Tabela 1 mostra de forma sucinta o papel de diversos fatores de virulência de *E. coli* na patogênese (BATISSON et al., 2003; KAPER et al., 2004).

Tabela 1. Alguns fatores de virulência de *E. coli* e suas funções na patogênese

Fator de virulência	Gene	Função	Localização
Shigatoxina 1 (Stx1)	<i>stx1</i>	Toxina	Bacteriófago
Shigatoxina 2 (Stx2)	<i>stx2</i>	Toxina	Bacteriófago
Intimina	<i>eae</i>	Adesão	Cromossomo
Enterotoxina termoestável (STa)	<i>estA</i>	Toxina	Plasmídio
Enterotoxina termoestável (STb)	<i>estB</i>	Toxina	Plasmídio
Enterotoxina termolábil (LT)	<i>eltB</i>	Toxina	Plasmídio
Bundle-forming pili (BFP)	<i>bfp</i>	Pilli tipo IV	Plasmídio

Enteroemolisina (EhxA)	<i>ehxA</i>	Toxina	Plasmídio
Adesina homóloga a IrgA (Iha)	<i>iha</i>	Adesão	Cromossomo
ToxB (proteína com homologia às toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>)	<i>toxB</i>	Adesão	Plasmídio
Adesina autoaglutinante de STEC (Saa)	<i>saa</i>	Adesão	Plasmídio
Fator para aderência de EHEC (Efa1/LifA)	<i>efa1</i>	Adesão/toxina	Plasmídio
Fímbria polar longa (LPF O113)	<i>lpfA</i> _{O113}	Adesão	Cromossomo
Fímbria polar longa (LPF O157/OI-141)	<i>lpfA</i> _{O157/OI-141}	Adesão	Cromossomo
Fímbria polar longa (LPF O26)	<i>lpfA</i> _{O26}	Adesão	Cromossomo
Fímbria S (SFA)	<i>sfa</i>	Adesão	Cromossomo
Adesina afimbrial (AFA)	<i>afa</i>	Adesão	Cromossomo
Fator necrotizante citotóxico 1 (CNF-1)	<i>cnf</i>	Toxina	Cromossomo
Fímbria P	<i>papC</i>	Adesão	Cromossomo
Aerobactina	<i>iucD</i>	Sideróforo	Plasmídio
Hemaglutinina sensível a temperatura (TSH)	<i>tsh</i>	Toxina	Plasmídio
Fímbria 17 (F17)	<i>f17</i>	Adesão	Cromossomo
Fímbria 18 (F18)	<i>f18</i>	Adesão	Plasmídio
Proteína associada a “attaching-effacing” em suínos (PAA)	<i>paa</i>	Adesão	Cromossomo
Enterotoxina termoestável de <i>E. coli</i> enteroagregativa 1 (EAST-1)	<i>astA</i>	Toxina	Plasmídio
Adesina envolvida na aderência difusa (AIDA)	<i>aidA</i>	Adesão	Plasmídio

Fonte: BATISSON et al. (2003) e KAPER et al. (2004)

As ETEC são grandes causadoras de diarreia em animais de fazenda e em crianças, além de estarem relacionadas à diarreia dos viajantes em países em desenvolvimento (KAPER et al., 2004; GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Esses microrganismos colonizam a superfície da mucosa intestinal e liberam as enterotoxinas LT (termolábil) e ST (termoestável) causando diarreia. Existem dois tipos de LT, LT-I e

LT-II. A primeira é encontrada em *E. coli* patogênica tanto para humanos quanto para animais e a segunda é encontrada principalmente em isolados provenientes de animais. Entretanto, tanto em animais quanto em humanos, LT-II não é associada a doenças. Os genes que codificam LT (*elt* ou *etx*) são encontrados em plasmídios que também podem conter os genes que codificam ST (NATARO & KAPER, 1998). As ST são divididas em STa (que é subdividida em STaP – produzida por ETEC bovina, suína e humana e STaH – produzida por ETEC humana) e STb (mais associada a suínos, mas também isolada em casos esporádicos de diarreia em humanos, bezerros e aves). Os sorogrupos de ETEC mais frequentemente associados a doenças em humanos são O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 e O173. Em ovinos as ETEC podem causar diarreia neonatal e geralmente pertencem aos sorogrupos O8, O9, O20, O64 e O101 (GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

Em relação à capacidade dos diferentes patótipos de *E. coli* em causar doença em seres humanos, a patogenicidade das aEPEC é controversa, pois cepas pertencentes a esse patótipo podem ser encontradas em amostras de pessoas saudáveis. Contudo, trabalhos recentes realizaram comparações estatísticas relacionadas à presença de certos genes de virulência e mostraram que houve uma associação entre a presença tanto dos genes *efa1/lifA* (AFSET et al., 2006) quanto *efa1/lifA*, *lpfA*, *paa*, *ehxA* (AFSET et al., 2006; NARIMATSU et al., 2010) e casos humanos de diarreia por aEPEC. Devido à dificuldade em se determinar essa patogenicidade, a detecção dos referidos genes é candidata a servir como marcador de potencial zoonótico de *E. coli* de origem animal.

Além disso, há outros marcadores de virulência para as *E. coli*, como por exemplo a presença de certos sorogrupos, juntamente com a presença de subtipos específicos de Stx2. Nesse sentido, existem alguns subtipos como Stx2 (também conhecidos como Stx2a) e Stx2d ativável pelo muco intestinal (Stx2_{dact}) que são ligados a doenças mais graves, como por exemplo, HUS e BD (FRIEDRICH et al., 2002; BIELASZEWSKA et al., 2006; PERSSON et al., 2007).

Genes relacionados à ExPEC já foram encontrados previamente em cepas de *E. coli* pertencentes à patótipos associados a diarreia (WU et al., 2007) e genes

associados a *E. coli* causadora de diarreia já foram detectados previamente em ExPEC (ABE et al., 2008), o que mostra que outros fatores, além daqueles tradicionais que caracterizam cada patótipo, podem ter um papel na patogênese. O fato da cepa O104:H4 de *E. coli* causadora do surto de HUS na Europa em 2011 apresentar características mistas de STEC e EAEC (BIELASZEWSKA et al., 2011), reforça essa possibilidade e justifica a necessidade de estudos contendo fatores de virulência de diferentes patótipos.

Os ovinos podem ser portadores de *E. coli* associada a doenças severas em humanos, tais como as STEC pertencentes ao sorogrupo O157 (KUDVA et al., 1996; CHAPMAN et al., 2001; DUFFY et al., 2010) ou STEC que apresenta Stx2_{dact} (GOBIUS et al., 2003; TASARA et al., 2008). Embora não seja um fato comum, EPEC típica já foi isolada de ovinos (WANI et al., 2009). As STEC e aEPEC têm sido detectadas em amostras fecais de ovinos em diferentes países, inclusive no Brasil, tanto em fazendas quanto em matadouros. Essas cepas portavam vários genes de virulência, tais como *stx1*, *stx2* e suas variantes, *ehxA*, *saa*, *astA* e *paa* (DJORDJEVIC et al., 2001; BLANCO et al., 2003; FROHLICHER et al., 2008; FAIRBROTHER et al., 2009; VETTORATO et al., 2009; COOKSON et al., 2010; DUFFY et al., 2010). Amostras de carcaças de ovinos podem portar STEC (OSÉS et al., 2010), inclusive O157:H7 (CHAPMAN et al., 2001; DUFFY et al., 2010).

Já foi demonstrado que os ovinos são reservatórios de *E. coli* associada a doenças graves em seres humanos usando marcadores clássicos de patogenicidade (como a determinação de sorogrupo por exemplo). Entretanto, uma nova abordagem procurando outros marcadores (como algumas adesinas em aEPEC), pode mostrar de uma outra maneira o potencial zoonótico. Por isso, foi conduzido este estudo mais aprofundado com *E. coli* em fezes e carcaças (considerando a possibilidade de doença de origem alimentar), procurando possíveis marcadores zoonóticos e incluindo um largo espectro de genes de virulência, tais como aqueles das adesinas putativas que não são codificadas na região LEE, genes relacionados à ExPEC, além dos subtipos de Stx2. A determinação da presença de diversos genes também pode contribuir para se entender melhor certas relações ecológicas de *E. coli*.

III. OBJETIVOS

1. Determinar a freqüência dos patótipos STEC, EPEC e ETEC em amostras e isolados provenientes de carcaças e fezes de ovinos em um matadouro-frigorífico e amostras fecais de ovinos e de água de diferentes fazendas no Estado de São Paulo com base na detecção de marcadores genéticos associados a cada patótipo.
2. Caracterizar os isolados de STEC, EPEC e ETEC através de: detecção de diversos genes, tais como aqueles relacionados à ExPEC e genes que codificam adesinas e toxinas; sorologia; características bioquímicas, resistência a antimicrobianos, determinação do subtipo da toxina Stx2 e estabelecimento de relação de similaridade com o intuito de se estabelecer os seus potenciais zoonóticos e características eco-epidemiológicas.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

População estudada e número de amostras

As amostras fezes e água foram colhidas em três fazendas de criação de ovinos e as amostras carcaças e fezes em um matadouro-frigorífico, todos esses estabelecimentos localizados no Estado de São Paulo, Brasil. A fazenda 1 é situada na cidade de Itápolis enquanto que as fazendas 2 e 3 e o matadouro-frigorífico estão localizados na cidade de Itapira. A Figura 1 apresenta um mapa que indica os locais das colheitas.



Figura 1. Mapa indicando as cidades nas quais as colheitas foram feitas. IT = Itápolis, IP = Itapira, JB = Jaboticabal.

As amostras provenientes das fazendas foram colhidas em um único dia enquanto as amostras de carcaças, no matadouro-frigorífico, foram colhidas em dois dias diferentes, com intervalo de duas semanas.

O número de amostras de fezes de ovinos na fazenda 1 foi n=112, na fazenda 2 n=50 e na fazenda 3 n=50, perfazendo um total de 212 e o número de amostras de água na fazenda 1 foi n=14, na fazenda 2 n=4 e na fazenda 3 n=2, totalizando 20. Todas as amostras fecais oriundas de ovinos foram colhidas de animais saudáveis, exceto 10 amostras colhidas de ovinos com diarreia na fazenda 1. Todos os ovinos eram criados a pasto. As amostras de água foram colhidas de lagos e bebedouros. No matadouro-frigorífico, foram colhidas 48 e 53 amostras fecais e 48 e 51 amostras de carcaças na primeira e segunda visita, respectivamente. As amostras de carcaças foram coletadas de ovinos abatidos antes do congelamento, ou seja, após a evisceração e lavagem das carcaças, e em paralelo à coleta de amostras fecais. O total de amostras foi então n=432. As amostras representaram em todos os casos (fazendas e matadouro-frigorífico) pelo menos 50% da população. A Tabela 2 mostra a distribuição das amostras entre os diferentes locais de colheita.

Tabela 2. Distribuição das amostras entre os diferentes locais de colheita.

	Fazenda 1	Fazenda 2	Fazenda 3	Matadouro- frigorífico (coleta 1)	Matadouro- frigorífico (coleta 2)	TOTAL
Fezes	112 ^a	50	50	48	53	313
Carcaças	-	-	-	48	51	99
Água (bebedouro)	12	4	2	-	-	18
Água (lagos)	2	-	-	-	-	2
TOTAL	126	54	52	96	104	432

^a Todas amostras colhidas de animais saudáveis, exceto dez de animais com diarreia.

Coleta e procedimentos iniciais

As amostras fecais dos animais foram colhidas do reto utilizando um suabe estéril o qual foi imediatamente colocado em tubos contendo água peptonada. As amostras de carcaças foram colhidas de três áreas de 25 cm² cada, das regiões da paleta, lombo e pescoço (área total de 75 cm²) (SUMNER et al., 2003) com uma esponja estéril que foi a seguir depositada em um sacos estéril contendo água peptonada. As amostras de água foram colhidas em volumes de 100 mL em recipientes estéreis. Todas as amostras (fezes, material de carcaça e água) foram mantidas em caixas térmicas até a chegada no laboratório (intervalo de tempo de 2-6 h).

No laboratório, as amostras fecais e de carcaças foram homogeneizadas e 100 µL de cada foi depositado em tubos contendo 5 mL de caldo verde brilhante (BGB – Himedia, India). Os tubos contendo BGB foram incubados aerobicamente a 37°C por 18h. Após esse período de incubação, 100 µL do BGB foi inoculado em agar McConkey (MA – Oxoid, Reino Unido). As amostras de água foram filtradas através de membranas de celulose contendo poros de 0,45 µm (Millipore, EUA), as quais foram colocadas sobre placas contendo MA. Todas as placas de MA foram incubadas aerobicamente a 37°C por 18 horas (APHA, 2005).

PCR para estabelecimento dos patótipos e obtenção de isolados

As culturas obtidas no agar MacConkey sofreram procedimentos diferentes no laboratório. As amostras de fezes e água de fazendas sofreram dois procedimentos (procedimento 1 e 2), enquanto que as amostras de fezes e carcaças do matadouro-matadouro-frigorífico foram submetidas somente ao procedimento 2. A Figura 2 esquematiza os dois procedimentos.

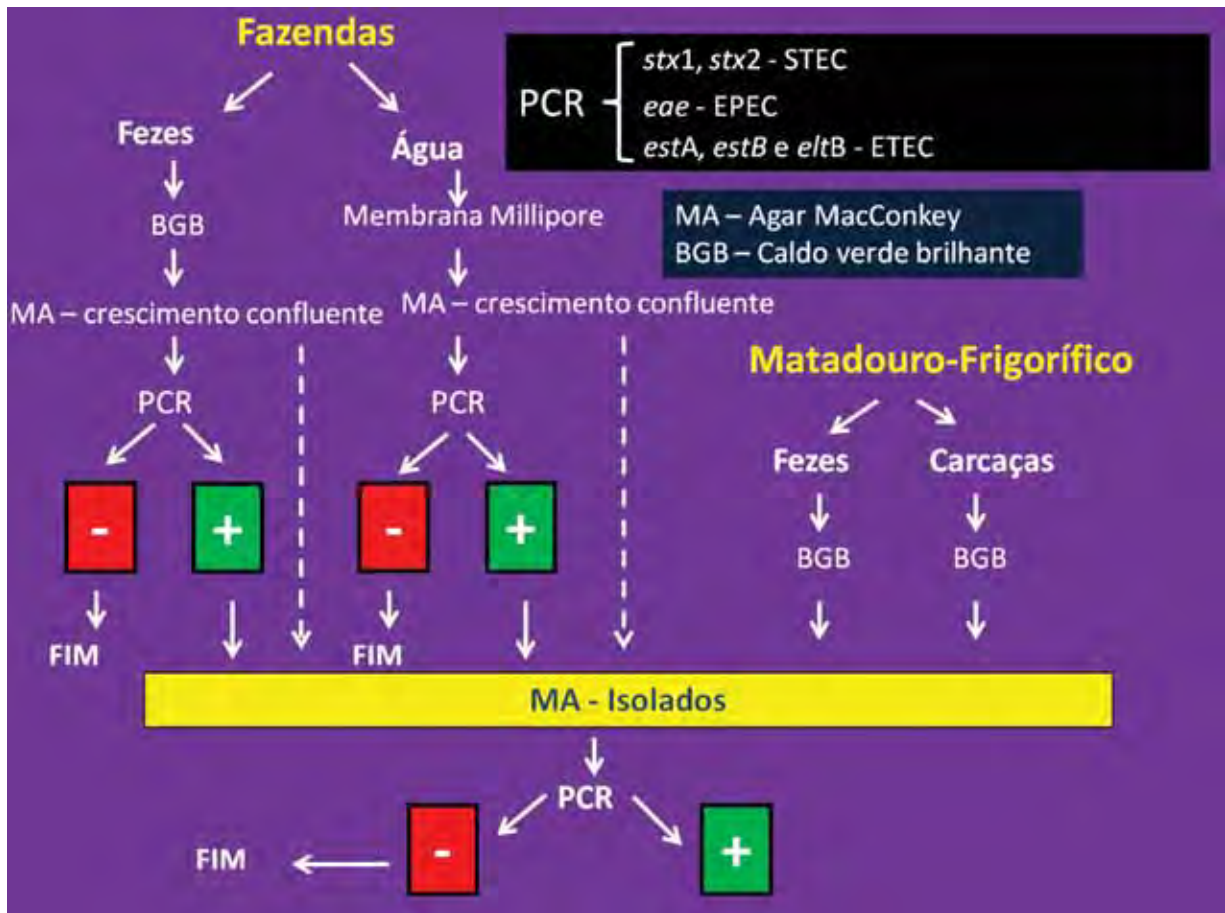


Figura 2. Fluxograma indicando os procedimentos adotados para se obter os isolados pertencentes aos patótipos STEC, EPEC e ETEC.

Procedimento 1

Uma alçada do crescimento confluyente proveniente do cultivo das placas de agar McConkey foi transferida para um tubo contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, Reino Unido), o qual foi incubado a 37°C por 18 horas para a preparação do DNA “template” através de uma lise térmica. Esse DNA foi usado para a realização de uma PCR para os genes que determinam os patótipos STEC, EPEC e ETEC (*stx1*, *stx2*, *eae*, *estA*, *estB* and *eltB*). A preparação do DNA “template” assim como os procedimentos de PCR e respectivos “primers” utilizados foram feitos de acordo com o protocolo do EcL disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx. A Tabela 4 mostra as

informações relacionadas aos “primers” usados nesse trabalho. As amplificações por PCR foram feitas com misturas contendo 2 mM de cada dNTP (GE Healthcare, EUA) 2,5µL de 10X PCR buffer, 2 mM de MgCl₂, 1,25 pmol de cada “primer”, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Espanha), 5 µL de DNA “template” e água para completar 25 µL. Dois conjuntos de “primers” foram usados para a PCR multiplex, um conjunto continha “primers” para *stx1*, *stx2* e *eae* e o outro para *estA*, *estB* e *eltB*. Os ciclos consistiram de um estágio inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos, cada um contendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento no T_m específico de cada “primers” por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos. Amostras positivas para qualquer dos genes citados foram usadas no procedimento 2.

Procedimento 2

A PCR foi realizada de maneira semelhante ao procedimento 1, com a diferença de que ao invés de se testar o crescimento confluyente, foram testadas colônias isoladas individualmente. Nas amostras de refrigerador que apresentaram positividade para qualquer gene no procedimento 1, até dez colônias foram testadas. As amostras de refrigerador negativas para todos os genes do procedimento 1 não tiveram colônias testadas. Como as amostras de refrigerador não sofreram o procedimento 1, foram testadas três colônias em todas as amostras.

Os isolados positivos nessa etapa foram usados nas demais etapas do trabalho. Entretanto quando a mesma amostra apresentou mais de um isolado com o mesmo perfil genético, somente um foi selecionado. No final dessa etapa foi possível determinar a qual patótipo o isolado pertencia.

Caracterização de genes de virulência (virotipagem) dos isolados

Os isolados foram testados em relação à presença de outros genes de virulência tanto por PCR quanto por hibridização de colônias. A Tabela 3 mostra quais fatores foram testados por cada método.

Tabela 3. Relação de genes de virulência usados na caracterização dos isolados e o método utilizado para suas detecções.

PCR	Hibridização de colônias
<i>bfp</i>	<i>aidA</i>
<i>ehxA</i>	<i>f17</i>
<i>iha</i>	<i>f18</i>
<i>saa</i>	<i>cnf1</i>
<i>toxB</i>	<i>sfa</i>
<i>efa1</i>	<i>papC</i>
<i>lpfA</i> _{O157/OI-141}	<i>iucD</i>
<i>lpfA</i> _{O113}	<i>paa</i>
<i>lpfA</i> _{O26}	<i>astA</i>
	<i>afa</i>
	<i>tsh</i>

Detecção de genes de virulência adicionais por PCR

A PCR foi feita seguindo o protocolo do EcL citado anteriormente e com os “primers”, temperaturas de anelamento e controles descritos na Tabela 4.

Detecção dos genes de virulência por hibridização de colônias (HC)

Outros genes de virulência foram pesquisados por hibridização de colônias (HC). Para se realizar esse teste as colônias foram inoculadas em agar Luria (Caldo Luria + Agar a 1,5%. Difco, EUA) e incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias foram então transferidas para filtros de papel Whatman 541 (Whatman, EUA). Os filtros foram processados, hibridizados e revelados por autoradiografia como descrito anteriormente (BROES et al., 1988). As sondas usadas nesse procedimento foram preparadas pela PCR relatada anteriormente usando-se “primers” e condições descritos na Tabela 4. Todos os isolados positivos na HC para *astA* foram testados novamente por PCR, considerando que esse gene pode estar incompleto.

Tabela 4. Lista de “primers” usados na PCR e na construção das sondas de DNA, condições das reações e amostras controle

Genes	Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Controle	Referência
<i>stx1</i>	for 5' TTAGACTTCTCGACTGCAAAG rev 5' TGTTGTACGAAATCCCCTCTG	530	60	EcL 6611	(WOODWARD et al., 1992)
<i>stx2</i>	for 5' TTATATCTGCGCCGGGTCTG rev 5' AGACGAAGATGGTCAAAACG	326	60	EcL 6611	(WOODWARD et al., 1992)
<i>eae</i>	for 5' CATTATGGAACGGCAGAGGT rev 5' ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA	790	60	EcL 6611	(BEAUDRY et al., 1996)
<i>estA</i>	for 5' TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG rev 5' GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	163	60	EcL 7805	(NGELEKA et al., 2003)
<i>estB</i>	for 5' GCAATAAGGTTGAGGTGAT rev 5' GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	368	60	EcL 7805	(LORTIE et al., 1991)
<i>eltB</i>	for 5' TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA rev 5' GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	275	60	EcL 7805	(FURRER et al., 1990)
<i>bfp</i>	for 5' GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT rev 5' GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300	60	E 2348/69	(VIDAL et al., 2004)
<i>ehxA</i>	for 5' CACACGGAGCTTATAATATTCTGTCA	340	55	EDL 933	(BONNET et al., 1998)

	rev 5' AATGTTATCCCATTGACATCATTGACT				
<i>iha</i>	for 5' CAGTTCAGTTTCGCATTACCC rev 5' GTATGGCTCTGATGCGATG	1.305	55	EDL 933	(SCHMIDT et al., 2001)
<i>toxB</i>	for 5' ATACCTACCTGCTCTGGATTGA rev 5' TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	602	50	EDL 933	(TARR et al., 2002)
<i>saa</i>	for 5' CGTGATGAACAGGCTATTGC rev 5' ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	55	EcL 10600	(PATON & PATON, 2002)
<i>efa1</i>	for 5' GAGACTGCCAGAGAAAAG rev 5' GGTATTGTTGCATGTTTCAG	479	50	EDL 933	(NICHOLLS et al., 2000)
<i>lpfA_{O113}</i>	for 5' ATGAAGCGTAATATTATAG rev 5' TTATTTCTTATATTCGAC	573	50	N89-O541	(DOUGHTY et al., 2002)
<i>lpfA_{O157/OI-141}</i>	for 5' CTGCGCATTGCCGTAAC rev 5' ATTTACAGGCGAGATCGTG	412	55	EDL 933	(SZALO et al., 2002)
<i>lpfA_{O26}</i>	for 5' CCGCTTGTGTTGTGTCTCC rev 5' AGCAGATTTACCAGTATTCA	295	60	H86-5075	(BIELASZEWSKA et al., 2005)
<i>sfa</i>	for 5' CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC rev 5' CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	60	EcL 6540	(LE BOUGUENEC et al., 1992)
<i>afa</i>	for 5' GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC rev 5' CATCAAGCTGTTTGTTTCGTCCGCCG	750	65	EcL 13455	(LE BOUGUENEC et al., 1992)
<i>cnf</i>	for 5' TTATATAGTCGTCAAGATGGA rev 5' CACTAAGCTTTACAATATTGAC	633	60	EcL 13455	(TOTH et al., 2003)

<i>papC</i>	for 5' GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG rev 5' ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	338	60	EcL 13421	(DAIGLE et al., 1994).
<i>iucD</i>	for 5' AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA rev 5' CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	778	60	EcL 3110	(HERRERO et al., 1988)
<i>tsh</i>	for 5' GGTGGTGCACCTGGAGTGG rev 5' AGTCCAGCGTGATAGTGG	620	60	EcL 3110	(DOZOIS et al., 2000)
<i>f17</i>	for 5' TATCCTTGAATACTGGCGG rev 5' CCAGTGGTGAATCCGTGTT	300	60	EcL 13455	(CID et al., 1999)
<i>f18</i>	for 5' GTGAAAAGACTAGTGTATTTTC rev 5' CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	510	55	EcL 1033	(IMBERECHTS et al., 1992)
<i>paa</i>	for 5' ATGAGGAACATAATGGCAGG rev 5' TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	350	60	EcL 6611	(BATISSON et al., 2003)
<i>astA</i>	for 5' TCGGATGCCATCAACACAGT rev 5' GTCGCGAGTGACGGCTTTGTAG	125	55	EcL 6611	(NGELEKA et al., 2003)
<i>aidA</i>	for 5' ACAGTATCATATGGAGCCA rev 5' TGTGCGCCAGAACTATTA	585	60	EcL 13511	(NGELEKA et al., 2003)

Sorologia

O sorogrupo dos isolados foi determinado usando-se a técnica de aglutinação em lâmina. Foram usados antissoros comerciais (Probac, São Paulo, Brasil) ou antissoros preparados a partir da coleção de *E. coli* do EcL. Os seguintes antígenos somáticos foram usados: O5, O6, O16, O26, O55, O75, O86, O91, O103, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O146, O149, O153, O157, O158 e O172.

Características bioquímicas e testes de resistência a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos: indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer, citrato e urease (MAC FADDIN, 1976). A fermentação da lactose foi registrada observando-se tanto as colônias nas placas de MA quanto as modificações nos tubos contendo agar TSI (Triple sugar iron, Oxoid, Reino Unido).

O teste de resistência a antimicrobianos foi realizado usando-se discos impregnados com antimicrobianos (Becton, Dickinson and Company - BD, EUA) recomendados pela agência de saúde pública do Canadá (PHAC). Após incubação por 16 horas em Agar sangue (Agar Base Sangue + sangue desfibrinado de ovino a 5%, DIFCO, EUA) cultivos dos isolados foram adicionadas a tubos contendo 10 mL de água estéril até o padrão 0,5 de MacFarland ser atingido. O conteúdo dos tubos foi então colocado em placas contendo agar Muller-Hinton utilizando-se suabes estéreis e então os seguintes discos foram colocados usando-se precauções assépticas: amoxicilina + ácido clavulânico (20 + 10 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), canamicina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), estreptomina (10 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), sulfisoxazol (0,25 mg) e sulfametoxazol + trimetoprim (23,75 + 1,25 µg). As placas foram incubadas a 37°C por 24h e os diâmetros dos halos de inibição completa foram medidos. Os halos foram comparados com os intervalos estabelecidos pelo CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE,

2007), exceto para o ceftiofur, para o qual foi utilizada outra referência do CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, 2008).

Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A preparação dos “plugs” e digestão do DNA genômico com *Xba*I (Invitrogen, EUA) foi feita de acordo com o protocolo utilizado no “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)” (RIBOT et al., 2006). As condições de eletroforese foram: tempo inicial de 2,2 segundo, tempo final de 54,2 segundos em um gradiente de 6 V cm⁻¹ e um ângulo de 120°. Os géis foram submetidos a eletroforese por 18h. A similaridade dos fragmentos foi comparada usando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização e o dendrograma foi construído com o método de agrupamento UPGMA, usando-se o programa BioNumerics. Os “clusters” foram estabelecidos pelo valor de “cut off” do BioNumerics versão 5.0.

Identificação das variantes de *stx2* por seqüenciamento de nucleotídeos

A identificação das variantes de *stx2* foi realizada através do seqüenciamento de parte da subunidade A e parte da subunidade B do gene *stx2* amplificadas por PCR (PERSSON et al., 2007). Os produtos de PCR foram purificados com um kit de purificação (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen, Alemanha) e seqüenciados no “Service de diagnostic – Faculté de Médecine Vétérinaire de L’Université de Montréal”. Os cromatogramas foram analisados usando-se o software Bioedit versão 7.0.5.3 (HALL, 1999).

A análise filogenética foi realizada com o software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) utilizando-se os aminoácidos deduzidos de parte das duas subunidades de *Stx2*, com o agrupamento realizado por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e usando-se o modelo de números diferentes de aminoácidos.

Números de acesso às seqüências de nucleotídeos

As seqüências de nucleotídeos das novas variantes encontradas nesse trabalho foram submetidas ao banco de dados do GenBank sob os números de acesso HQ738536 (Stx2d3a-NT-35-C-C), HQ738537 (Stx2d3d2-NT-63-R-A), HQ738538 (Stx2c-NT-164A1) e HQ738539 (Stx2e-NT-46RB).

V. RESULTADOS

Freqüência de STEC, EPEC e ETEC em fazendas

Após enriquecimento, todas as amostras (fezes e água) coletadas de ovinos oriundas de fazendas foram submetidas a uma triagem por PCR para a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *estA*, *estB* e *eltB*. Das 126 amostras analisada na Fazenda 1, foram encontrados genes relacionados a STEC (*stx1* e/ou *stx2*) em 53, EPEC (*eae*) em 3 amostras e STEC+EPEC (*stx1* e/ou *stx2* e *eae*) em 1 amostra, sendo a maioria proveniente de animais saudáveis, exceto uma amostra de água e uma de um animal doente (ambas STEC). Das 54 amostras da fazenda 2, foram encontrados genes relacionados a STEC em 22 amostras e genes relacionados a EPEC em 1 amostra. Das 52 amostras da fazenda 3 foram encontradas 23 relacionadas a STEC, 9 a EPEC e 5 a STEC+EPEC. Nenhum dos genes de ETEC (*estA*, *estB* e *eltB*) foi encontrado. A freqüência de amostras positivas para STEC (considerando STEC e STEC + EPEC) foi de aproximadamente 40% nas fazendas 1 e 2 e 50% na fazenda 3 (Tabela 5). Por outro lado, a freqüência de amostras positivas para EPEC (considerando EPEC e STEC + EPEC) foi muito maior na fazenda 3 (cerca de 25%) do que nas outras duas fazendas (menos de 5%) (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição das amostras positivas para os genes *stx1*, *stx2* e *eae* nas diferentes fazendas de ovinos no Estado de São Paulo^a

	<i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i> (STEC)		<i>eae</i> (EPEC)		<i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i> e <i>eae</i> (STEC + EPEC)		Negativo		TOTAL
	n	%	n	%	n	%	n	%	
	Fazenda1	53 ^b	42,1	3	2,4	1	0,8	69	
Fazenda2	22	40,7	1	1,9	0	0	31	57,4	54
Fazenda3	23	44,2	9	17,3	5	9,6	15	28,8	52
TOTAL	98	42,2	13	5,6	6	2,6	115	49,6	232

^a Todas as amostras foram negativas para *estA*, *estB* e *eItB*

^b Todas as amostras positivas foram encontradas em animais saudáveis, exceto uma amostra de um animal doente e uma amostra de água (ambas na Fazenda 1). Nas demais fazendas só foram encontradas amostras positivas em animais saudáveis.

No máximo 10 colônias isoladas de cada amostra positiva na triagem foram testadas por PCR para *stx1*, *stx2* e *eae* (quando mais de um isolado da mesma amostra teve o mesmo perfil de *eae*, *stx1* e *stx2*, somente um deles foi selecionado). Um total de 44 isolados de STEC e 8 isolados de EPEC foram recuperados de 104 (42,3%) e 19 (42,1%) amostras positivamente classificadas como STEC (considerando STEC e STEC + EPEC) e EPEC (considerando EPEC e STEC + EPEC) respectivamente. Todos os isolados foram recuperados de animais saudáveis. O número de amostras positivas para um único isolado de STEC foi 27, 8 e 5, e de amostras positivas para um único isolado de EPEC foi 1, 1 e 4, para fazendas 1, 2, e 3 respectivamente. Duas amostras apresentaram uma cepa de EPEC e uma cepa de STEC ao mesmo tempo (Fazendas 1 e 3) e uma amostra demonstrou dois isolados diferentes de STEC (Fazenda 2). A frequência de amostras que geraram isolados positivos para STEC, foi

muito menor do que na PCR de enriquecimento inicial, sendo de aproximadamente 20% nas fazendas 1 e 2 e aproximadamente 10% na fazenda 3. De forma semelhante, a frequência de amostras positivas para EPEC, quando baseada na presença de isolados positivos, foi menor que 2% nas fazendas 1 e 2 e aproximadamente 10% na fazenda 3 (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das amostras positivas para os genes *stx1*, *stx2* e *eae* nas diferentes fazendas de ovinos no Estado de São Paulo que geraram pelo menos um isolado positivo de STEC e/ou EPEC. A frequência foi calculada em relação ao total de amostras, incluindo positivas e negativas.

	Um isolado de STEC		Um isolado de EPEC		Dois isolados de STEC ^a		Um isolado de STEC e um isolado de EPEC		Negativo		TOTAL
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Fazenda1	27	21,4	1	0,8	0	0	1	0,8	97	77,0	126
Fazenda2	8	14,8	1	1,9	1	1,9	0	0	44	81,5	54
Fazenda3	5	9,6	4	7,7	0	0	1	1,9	42	80,8	52
TOTAL	40	45,9	6	10,3	1	1,9	2	2,7	183	78,9	232

^a Cada isolado com um perfil genético diferente.

Frequência de STEC, EPEC e ETEC no matadouro-frigorífico

Três colônias de cada amostra do matadouro-frigorífico foram testadas por PCR (para a detecção de *stx1*, *stx2*, *eae*, *estA*, *estB* e *eitB*). A colheita no matadouro-frigorífico foi feita duas vezes. Na primeira, 48 carcaças e fezes de animais ainda vivos foram analisadas, tendo sido detectada a presença de 5 EPEC e 2 STEC em animais e 10 EPEC e 1 STEC em carcaças. Na segunda colheita, 53 animais e 51 carcaças foram analisados, encontrando-se 6 STEC em fezes e 1 uma STEC em carcaça (Tabela 7), enquanto que EPEC foi isolada de aproximadamente 10% dos animais e 20% das carcaças na primeira colheita, STEC foi isolada de aproximadamente 10% dos animais e 2% das carcaças no dia 2 (Tabela 7). O patótipo ETEC não foi encontrado. No matadouro-frigorífico, todas as amostras positivas geraram somente um isolado de STEC ou EPEC, levando-se em consideração que quando mais de um isolado da mesma amostra apresentou o mesmo perfil de genes, somente um foi selecionado.

Tabela 7. Distribuição de amostras que geraram isolados de STEC ou EPEC no matadouro-frigorífico localizado no Estado de São Paulo^a.

	STEC		EPEC		Negativo		TOTAL
	n	%	n	%	n	%	n
Fezes (dia1)	2	4,2	5	10,4	41	85,4	48
Carcaças (dia1)	1	2,1	10	20,8	37	77,1	48
Fezes (dia2)	6	11,3	0	0,0	47	88,7	53
Carcaças (dia2)	1	2,0	0	0,0	50	98,0	51
TOTAL	10	5,0	15	7,5	175	87,5	200

^a Cada amostra gerou somente um isolado.

Total de cepas de STEC e EPEC

Nas fazendas e no matadouro-frigorífico foi isolado um total de 54 cepas de STEC e 23 cepas de EPEC. Se por um lado as STEC estiveram distribuídas de forma similar nas fazendas 1 e 2, as EPEC foram mais freqüentes na primeira colheita do matadouro-frigorífico e na fazenda 3.

Presença de genes de virulência nas cepas

As cepas de STEC e EPEC foram submetidas à PCR e hibridização de colônias para a detecção de genes de virulência. Todas as EPEC foram negativas para o gene *bfp*, e por isso foram classificadas com aEPEC (EPEC atípica). A Tabela 8 mostra o resultado desses testes. A Tabela 9 mostra a freqüência dos diversos genes de virulência nas cepas.

Tabela 8. Local de colheita e características das cepas isoladas de STEC e aEPEC isoladas de ovinos no Estado de São Paulo.^a

Local de colheita ^b	Identificação	Patótipo	Sorogrupo	Definição de patótipo			Relac. EHEC		Adesinas Putativas							Relac. AEEC	Relac. ExPEC		Miscelânea
				eae	stx1	stx2	ehxA	lpfA _{O113}	lpfA _{O26}	lpfA _{O157/O141}		iha	saa	tox B	efa 1	paa	tsh	iuc D	astA
CA1	48C-A	aEPEC	O5	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	
CA1	30C-C	aEPEC	NT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	
CA1	4C-C	aEPEC	NT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
CA1	5C-C	aEPEC	NT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
CA1	25C-A	aEPEC	NT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FA1	22R-C	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FA1	31R-A	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FA1	43R-A	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FA1	48R-A	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CA1	32C-C	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CA1	39C-C	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CA1	43C-C	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CA1	47C-A	aEPEC	O146	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F1	134B-7	aEPEC	NT	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
FA1	38R-A	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
F2	258A-1	aEPEC	O145	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	
F3	283A-1	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
F3	299B-5	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
F3	319A-2	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
F3	320B-8	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
F3	321B-8	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
F1	125B-4	aEPEC	O125	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

CA1	41C-A	aEPEC	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F2	264A-1	STEC	O91	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
F2	275B-10	STEC	O91	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
F1	132A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	152A-2	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	128A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	114B-4	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	122B-7	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	131A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	156A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	182A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	138A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	153A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	158A-A	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	165A-3	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	170A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FA2	76R-A	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F3	319A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F3	325A-2	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	124A-1	STEC	NT	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	108B-4	STEC	O5	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	112A-1	STEC	O5	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	181A-2	STEC	O5	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	107A-1	STEC	O75	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
F1	177A-1	STEC	O75	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
F1	155B-9	STEC	O75	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	181A-2	STEC	NT	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F3	304A-1	STEC	NT	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F2	240A-1	STEC	NT	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F3	327B-9	STEC	NT	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

F2	274B-4	STEC	NT	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F1	105A-1	STEC	NT	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
F1	137A-2	STEC	NT	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
F1	157B-9	STEC	NT	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
F1	161B-5	STEC	NT	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
F2	261A-2	STEC	NT	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
F1	147A-1	STEC	O5	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F2	239A-3	STEC	NT	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	244A-2	STEC	NT	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA1	35C-C	STEC	NT	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
FA1	29R-C	STEC	NT	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
FA2	53R-A	STEC	NT	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F2	229A-2	STEC	NT	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F2	267A-1	STEC	NT	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F2	275A-1	STEC	NT	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F3	324A-1	STEC	NT	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
FA2	63R-A	STEC	NT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FA2	86R-C	STEC	NT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
F1	164A-1	STEC	NT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FA1	46R-B	STEC	NT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F1	197A-3	STEC	NT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FA2	60R-C	STEC	NT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FA2	61R-A	STEC	NT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CA2	78C-B	STEC	NT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
F3	328B-10	STEC	NT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Todos os isolados foram negativos para *bfp*, *f18*, *cnf*, *f17*, *afa*, *sfa*, *papC* e *aidA*

^b F1 – Fazenda 1, F2 – Fazenda 2, F3 – Fazenda 3, FA1 – Fezes matadouro-frigorífico – coleta 1, CA1 – Carcaças matadouro-frigorífico – coleta 1, FA2 – Fezes matadouro-frigorífico – coleta 2, CA2 – Carcaças matadouro-frigoríficos – coleta 2

Tabela 9. Frequência dos diversos genes de virulência nas cepas de STEC e aEPEC isoladas de ovinos no Estado de São Paulo ^a.

	Frequência dos genes (%)											
	<i>ehxA</i>	<i>lpfA</i> O113	<i>lpfA</i> O26	<i>lpfA</i> O157/O141	<i>iha</i>	<i>saa</i>	<i>toxB</i>	<i>efa1</i>	<i>paa</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>astA</i>
aEPEC	8,7	60,9	60,9	4,3	8,7	0	4,3	21,7	47,8	26,1	8,7	8,7
STEC (stx1+, stx2+)	76,7	100	6,7	0	100	0	0	0	0	0	6,7	6,7
STEC (stx1+, stx2-)	56,3	100	0	0	56,3	0	0	0	0	62,5	0	0
STEC (stx1-, stx2+)	31,3	68,8	12,5	0	31,3	6,3	0	0	37,5	0	0	0
STEC (todas)	63,0	90,7	7,4	0	75,9	1,9	0	0	11,1	9,3	3,7	3,7
TOTAL (STEC + aEPEC)	46,8	81,8	23,4	1,3	55,8	1,3	1,3	6,5	22,1	14,3	5,2	5,19

^a Todos os isolados foram negativos para *bfp*, *f18*, *cnf*, *f17*, *afa*, *sfa*, *papC* e *aidA*

Sorologia

Somente oito cepas de STEC (14,8%) foram tipáveis através de sorologia enquanto 11 cepas de aEPEC (47,8%) foram tipáveis. Portanto, no total, 19 cepas desse trabalho foram tipáveis, o que representa 24,7%. A Tabela 8 mostra o resultado da sorologia para cada cepa.

Testes bioquímicos

Em geral, as cepas de STEC e aEPEC demonstraram reações bioquímicas regulares para *E. coli* (lactose+, indol+, citrato-, VM+, VP- e urease-), exceto uma cepa urease positiva, duas indol negativa e duas citrato positiva. A Tabela 10 mostra os resultados dos testes bioquímicos para cada cepa.

Tabela 10. Características bioquímicas das cepas de STEC e aEPEC isoladas de ovinos no Estado de São Paulo^a.

Cepa	Indol	Vermelho de	Voges-Proskauer	Citrato	Urease
		Metila	(VP)		
105 A1	+	+	+	+	-
107 A1	+	+	+	-	-
108 B4	+	+	+	-	-
112 A1	+	+	+	-	-
114 B4	+	+	+	-	-
122 B7	+	+	+	-	-
124 A1	+	+	+	-	-
125 A1	+	+	+	-	-
125 B4	+	+	+	-	-
128 A1	+	+	+	-	-
131 A1	+	+	+	-	-
132 A1	+	+	+	+	-
134 B7	+	+	+	-	-
137 A2	+	+	+	-	-
138 A1	+	+	+	-	-
147 A1	+	+	+	-	-
152 A2	+	+	+	-	-
153 A1	+	+	+	-	-
155 B9	+	+	+	-	-
156 A1	+	+	+	-	-
157 B9	+	+	+	-	-
158 A1	+	+	+	-	-
161 B5	+	+	+	-	-
164 A1	+	+	+	-	-
165 A3	+	+	+	-	-

170 A1	+	+	+	-	-
177 A1	+	+	+	-	-
181 A2	+	+	+	-	-
182 A1	+	+	+	-	-
197 A3	+	+	+	-	-
229 A2	+	+	+	-	-
239 A3	+	+	+	-	-
240 A1	+	+	+	-	-
244 A2	+	+	+	-	-
258 A1	+	+	+	-	+
261 A2	+	+	+	-	-
264 A1	-	+	+	-	-
267 A1	+	+	+	-	-
274 B4	+	+	+	-	-
275 A1	+	+	+	-	-
275 B10	-	+	+	-	-
283 A1	+	+	+	-	-
299 B5	+	+	+	-	-
304 A1	+	+	+	-	-
319 A1	+	+	+	-	-
319 A2	+	+	+	-	-
320 B8	+	+	+	-	-
321 B8	+	+	+	-	-
324 A1	+	+	+	-	-
325 A2	+	+	+	-	-
327 B9	+	+	+	-	-
328 B10	+	+	+	-	-
4C C	+	+	+	-	-
5C C	+	+	+	-	-

25C A	+	+	+	-	-
30C C	+	+	+	-	-
32C C	+	+	+	-	-
35C C	+	+	+	-	-
39C C	+	+	+	-	-
41C A	+	+	+	-	-
43C C	+	+	+	-	-
47C A	+	+	+	-	-
48C A	+	+	+	-	-
78C B	+	+	+	-	-
22R C	+	+	+	-	-
29R C	+	+	+	-	-
31R A	+	+	+	-	-
38R A	+	+	+	-	-
43R A	+	+	+	-	-
46R B	+	+	+	-	-
48R A	+	+	+	-	-
53R A	+	+	+	-	-
60R C	+	+	+	-	-
61R A	+	+	+	-	-
63R A	+	+	+	-	-
76R A	+	+	+	-	-
86R C	+	+	+	-	-

^a Todas as cepas apresentaram reações regulares para *E. coli* no agar TSI (base e ápice amarelos com formação de gás).

Testes de resistência a antimicrobianos

Em relação às cepas isoladas nesse trabalho, uma foi resistente ao ácido nalidíxico, uma a tetraciclina, uma a ampicilina e quatro a estreptomicina. As demais cepas não mostraram resistência a qualquer antimicrobiano. A Tabela 11 mostra o resultado do teste de resistência a antimicrobianos para cada cepa.

Tabela 11. Perfil de resistência das cepas de STEC e aEPEC isoladas de ovinos no Estado de São Paulo^a.

	Ácido Nalidíxico	Tetraciclina	Amoxicilina +Ac. Clavulânico	Cloranfenicol	Ampicilina	Estreptomicina	Canamicina	Sulfisoxazol
105 A1	S	S	S	S	S	S	S	S
107 A1	S	S	S	S	S	S	S	S
108 B4	S	S	S	S	S	S	S	S
112 A1	S	S	S	S	S	I	S	I
114 B4	S	S	S	S	S	S	S	S
122 B7	S	S	S	S	S	S	S	S
124 A1	S	S	S	S	S	S	S	S
125 A1	S	S	S	S	S	R	S	S

267	S	S	S	S	S	S	S	S
A1								
274	S	S	S	S	S	S	S	S
B4								
275	S	S	S	S	S	S	S	S
A1								
275	S	S	S	S	S	S	S	S
B10								
283	S	S	S	S	S	S	S	S
A1								
299	S	S	S	S	S	S	S	S
B5								
304	S	S	S	S	I	S	S	S
A1								
319	S	S	S	S	I	R	S	S
A1								
319	S	S	S	S	S	S	S	S
A2								
320	S	S	S	S	I	S	S	S
B8								
321	S	S	S	S	I	S	S	S
B8								
324	S	S	S	S	S	S	S	S
A1								
325	S	S	S	S	S	S	S	S
A2								
327	S	S	S	S	S	S	S	S
B9								
328	S	R	S	S	S	S	S	I

38R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A									
43R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A									
46R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
B									
48R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A									
53R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A									
60R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C									
61R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A									
63R	S	S	S	S	S	S	S	S	I
A									
76R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A									
86R	S	S	S	S	S	S	S	S	I
C									
105	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A1									

^a S = Sensível, I = Intermediário, R = Resistente

^b Todas as cepas foram sensíveis ao sulfametoxazol + trimetoprim, gentamicina, ciprofloxacina, ceftiofur, ceftriaxona, amicacina e cefoxitina.

PFGE

Dentre as 77 cepas isoladas nesse trabalho, seis não foram tipáveis utilizando-se a enzima *Xba*I no PFGE. As 71 cepas tipáveis geraram 43 perfis diferentes de PFGE. Cada perfil diferente de PFGE foi denominado um “pulsetype” (PT). Por padronização, as cepas não tipáveis também foram agrupadas como “pulsetypes”, mesmo não tendo perfil de PFGE. A Tabela 12 mostra a qual “pulsetype” cada cepa foi designada, de forma que cepas pertencentes ao mesmo clone compartilharam perfis de PFGE idêntico. Além desse perfil de PFGE idêntico, todos os “pulsetypes” compartilharam o mesmo perfil de genes de virulência. Esses “pulsetypes” foram usados para a construção do dendrograma de similaridade (Figura 3). O dendrograma gerado por PFGE apresentou sete “clusters”.

Tabela 12. Relação de perfis idênticos de PFGE (“pulsetypes”) e suas respectivas cepas.

“Pulsetypes”	Cepa	Patótipo
PT1	48C-A	aEPEC
PT2	30C-C	aEPEC
PT3	4C-C	aEPEC
	5C-C	aEPEC
PT4	25C-A	aEPEC
PT5	22R-C	aEPEC
	31R-A	aEPEC
	43R-A	aEPEC
	48R-A	aEPEC
	32C-C	aEPEC
	39C-C	aEPEC
	43C-C	aEPEC
PT6	47C-A	aEPEC
	134B-7	aEPEC
PT7	38R-A ^a	aEPEC
PT8	258A-1	aEPEC
	283A-1	aEPEC
	299B-5	aEPEC
	319A-2	aEPEC
	320B-8	aEPEC
PT9	321B-8	aEPEC
	125B-4	aEPEC
PT10	41C-A	aEPEC
PT11		

PT12	264A-1	STEC
	275B-10	STEC
PT13	132A-1	STEC
	152A-2	STEC
PT14	128A-1	STEC
	114B-4	STEC
PT15	122B-7	STEC
	131A-1	STEC
	156A-1	STEC
	182A-1	STEC
PT16	138A-1	STEC
	153A-1	STEC
PT17	158A-A	STEC
	165A-3	STEC
	170A-1	STEC
	76R-A	STEC
	319A-1	STEC
PT18	325A-2	STEC
	124A-1	STEC
PT19	108B-4	STEC
PT20	112A-1	STEC
PT21	181A-2	STEC
PT22	107A-1	STEC
	177A-1	STEC
PT23	155B-9	STEC
PT24	181A-2	STEC
PT25	304A-1	STEC
PT26	240A-1	STEC
PT27	327B-9	STEC
PT28		

PT29	274B-4	STEC
PT30	105A-1 ^a	STEC
PT31	137A-2 ^a	STEC
PT32	157B-9 ^a	STEC
PT33	161B-5 ^a	STEC
PT34	261A-2 ^a	STEC
PT35	147A-1	STEC
PT36	239A-3	STEC
	244A-2	STEC
PT37	35C-C	STEC
PT38	29R-C	STEC
PT39	53R-A	STEC
PT40	229A-2	STEC
	267A-1	STEC
PT41	275A-1	STEC
PT42	324A-1	STEC
PT43	63R-A	STEC
	86R-C	STEC
PT44	164A-1	STEC
PT45	46R-B	STEC
PT46	197A-3	STEC
PT47	60R-C	STEC
PT48	61R-A	STEC
	78C-B	STEC
PT49	328B-10	STEC

^a Não tipáveis por PFGE usando-se *Xba*I.

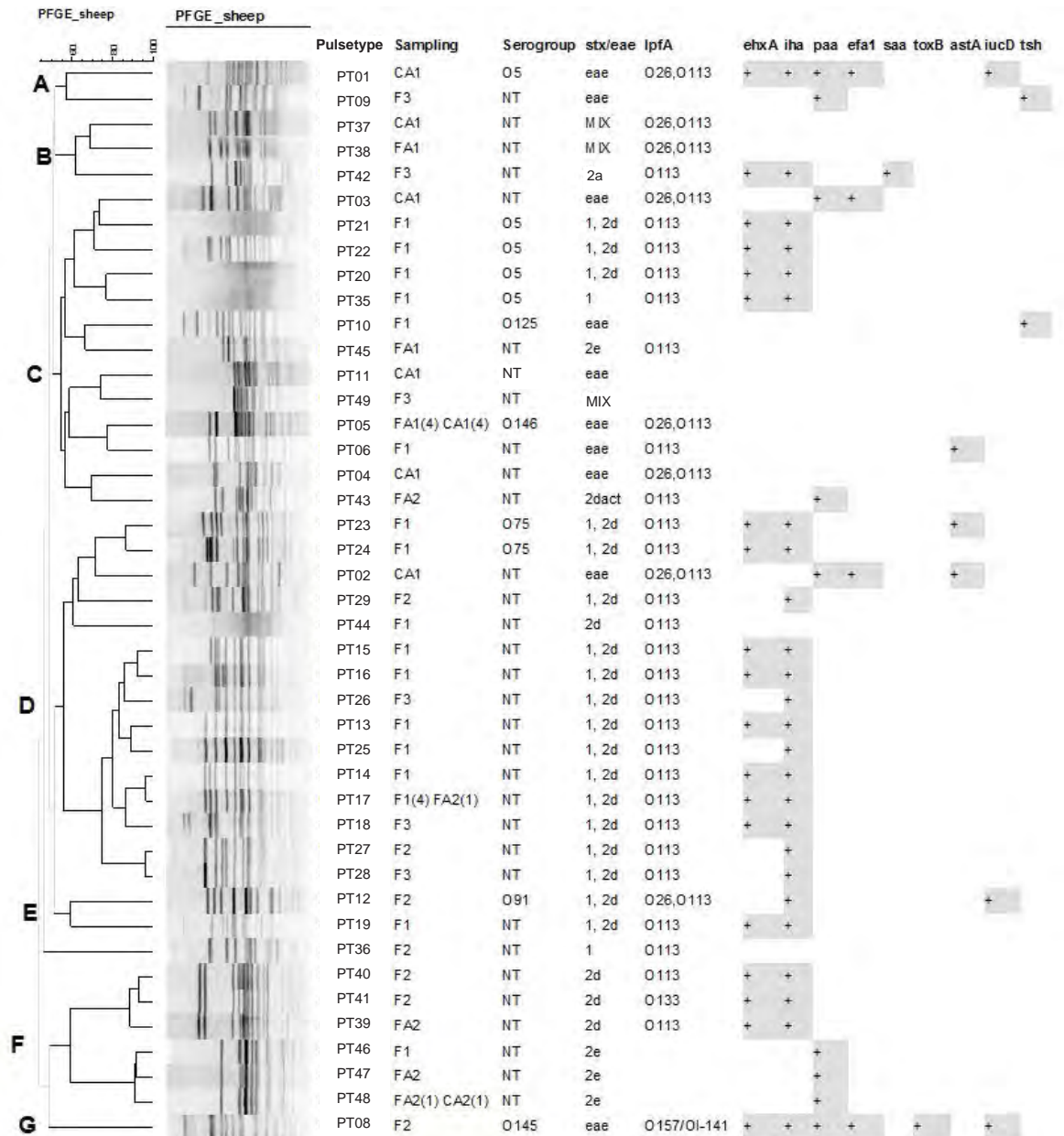


Figura 3. Dendrograma mostrando relação de similaridade estabelecida por PFGE. MIX indica subtipos de Stx2 constituídos pela subunidade A de um subtipo e pela subunidade B de outro. F1 – Fazenda 1, F2 – Fazenda 2, F3 – Fazenda 3, FA1 – Fezes matadouro-frigorífico – coleta 1, CA1 – Carcaças matadouro-frigorífico – coleta 1, FA2 – Fezes matadouro-frigorífico – coleta 2, CA2 – Carcaças matadouro-frigorífico – coleta 2, NT – Não tipável

Subtipagem de Stx2

As cepas de STEC que apresentaram *stx2* tiveram parte da subunidade A e parte da subunidade B seqüenciada, com o objetivo de se determinar seu subtipo e variante. Existe mais de um sistema de classificação de subtipos de Stx2. Nesse trabalho nós usamos dois sistemas que foram previamente publicados (PERSSON et al., 2007; SLANEC et al., 2009). Quando comparados aos dois sistemas, os resultados mostraram que algumas cepas apresentaram variantes e subtipos já conhecidos e também novas variantes. Uma variante é considerada nova quando a toxina apresenta a substituição de um resíduo de aminoácido e deve ser denominada com base no sorotipo e identificação da cepa na qual ela foi encontrada. Adicionalmente, nesse trabalho, algumas cepas apresentaram a subunidade A pertencente a um subtipo conhecido e subunidade B pertencente a outro subtipo já conhecido. No presente momento não existe uma regra para se classificar e denominar toxinas que apresentem essas características. Devido a isso, nós as classificamos como novas variantes e adaptamos a regra para denominá-las. A Tabela 13 mostra o resultado da subtipagem de Stx2, detalhando as variantes previamente conhecidas que foram encontradas nesse trabalho e também as novas variantes. Os alinhamentos contendo as novas variantes comparado com o sistema publicado por PERSSON et al. (2007) e o dendrograma baseado nesse alinhamento podem ser vistos nas Figuras 4 e 5 respectivamente.

Considerando que na maioria dos relatos adota-se a classificação de subtipos compilada no trabalho publicado por SLANEC et al. (2009), para relatar os nossos resultados e compará-los com dados com trabalhos já publicados foi usada esta classificação. Entretanto, para se denominar as novas variantes, foi usada a regra descrita no parágrafo anterior, pois essa regra foi estabelecida na última conferência de VTEC (7th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*) que aconteceu em Buenos Aires – Argentina em 2009, é esperado que esse sistema de classificação seja usado como padrão (Tabela 13).

Tabela 13. Subtipos e variantes de Stx2 encontrados (novas variantes são similares as variantes de Stx2 descritas na Tabela, com as substituições no rodapé).

"Pulsetype"	Variante de Stx2 ^a		Subtipo de Stx2 ^a		Subtipo de Stx2 ^b		Denominação da nova variante	Número de acesso ao GenBank
	Subunidade A	Subunidade B	Subunidade A	Subunidade B	Subunidade A	Subunidade B		
12	Stx2c-O118-EH250	Stx2c-O118-EH250	2c	2c	2d	2d	-	AF043627
13-29, 39-41	Stx2c-O111-PH	Stx2c-O111-PH	2c	2c	2d	2d	-	L11078
37, 38, 49	Stx2d3-O157-7279 ¹	Stx2-O48-94C	2d3	2a	2d _{act}	2a	Stx2d3a-NT-35-C-C	HQ738536
42	Stx2-O48-94C	Stx2-O48-94C	2a	2a	2a	2a	-	Z37725
43	Stx2d3-O157-7279	Stxd2d-O73-C165-02	2d3	2d2	2d _{act}	2d _{act}	Stx2d3d2-NT-63-R-A	HQ738537
44	Stx2c-O111-PH ²	Stx2c-O111-PH	2c	2c	2d	2d	Stx2c-NT-164A1	HQ738538
45	Stx2e-O101-E-D43 ³	Stx2e-O101-E-D43	2e	2e	2e	2e	Stx2e-NT-46RB	HQ738539
46-48	Stx2e-ONT-26725-97	Stx2e-ONT-26725-97	2e	2e	2e	2e	-	AJ567998

^a De acordo com os resultados de PERSSON et al. (2007) e comunicação pessoal de SCHEUTZ*

^b De acordo com os resultados publicados por SLANEC et al. (2009)

¹Substituição T268A

²Substituição M292R

³Substituição L311S

* SCHEUTZ, F. (Statens Serum Institut, Dinamarca). Comunicação pessoal, 2011.

Subunidade A de Stx2 (parcial)

	230	240	250	260	270	280	290	300	310			
Stx2-O48-94C	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGK
Stx2c-O111-PH	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE
Stx2d-O73-C165-02	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE
Stx2e-O101-E-D433	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE
Stx2c-NT-164A1	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE
Stx2d3a-NT-35-C-C	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE
Stx2d3d-NT-63-R-A	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE
Stx2e-NT-46RB	GRISNVLPEYRGE	DGVRVGR	SFNNISAI	LGTVAVI	LNCHHGGARS	SVRAVNEE	ESQPECQIT	GDPRPVI	KINNTLWES	SNTAAAF	LNRKSSQ	SLYTTGE

Subunidade B de Stx2 (parcial)

	10	20	30	40	50	60		
Stx2-O48-94C	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2c-O111-PH	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2d-O73-C165-02	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2e-O101-E-D433	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2c-NT-164A1	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2d3a-NT-35-C-C	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2d3d-NT-63-R-A	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT
Stx2e-NT-46RB	MKKMF	MAVLFALV	SVNAMAADCAK	GKIEFSKYNE	NDTFTVKV	DGKEYWTSR	RWNLQPLL	LQSAQLT

Figura 4. Alinhamento de resíduos de aminoácidos das novas variantes encontradas em relação ao sistema de classificação publicado por PERSSON et al. (2007), o qual foi utilizado para suas denominações. Seqüências publicadas por PERSSON et al. (2007) e respectivos números de acesso no GenBank: Stx2d3-O157-7279 (X61283); Stx2-O48-94C (Z37725); Stx2d-O73-C165-02 (DQ059012); Stx2c-O111-PH (L11078) e Stx2e-O101-E-D433 (X814117). Seqüências de novas variantes encontradas nesse trabalho, eventuais substituições nos resíduos de aminoácidos e respectivos números de acesso no GenBank: Stx2d3a-NT-35-C-C, T268A (HQ738536); Stx2d3d-NT-63-R-A (HQ738537); Stx2c-NT-164A1, M292R (HQ738538) e Stx2e-NT-46RB, L311S (HQ738539).

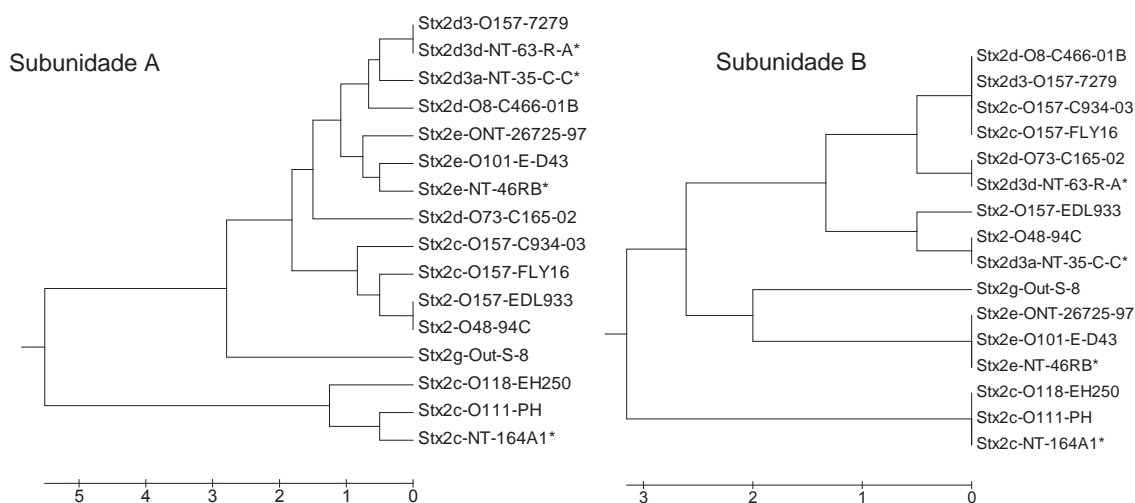


Figura 5. Dendrogramas construídos através do modelo de números diferentes de aminoácidos e agrupamento por UPGMA de parte da Subunidade A e Subunidade B de Stx2. As seqüências com asterisco representam novas variantes encontradas nesse trabalho. As demais seqüências foram obtidas do trabalho publicado por PERSSON et al. (2007).

Características gerais das cepas encontradas

Nessa seção são apresentados os achados mais relevantes com base no conjunto de resultados obtidos no trabalho. Para melhor entendimento, os comentários referentes à STEC foram divididos em três seções enquanto aqueles referentes à aEPEC foram apresentados em uma única seção.

Cepas de STEC *stx1*- *stx2*+

Nesse subgrupo de STEC houve certa heterogeneidade em relação aos padrões de genes de virulência (Tabela 8 e Figura 3). Além disso, foram encontrados tipos diferentes de Stx2, incluindo o protótipo Stx2 (Stx2a) e o subtipo Stx2_{dact}. A única cepa que apresentou o protótipo Stx2 foi também a única que apresentou o gene *saa* deste trabalho. As cepas com Stx2e carregavam o gene *paa* e não apresentaram qualquer variante do gene *lpfA* (Figura 3). Assim como todas as STEC deste trabalho, as cepas desse grupo não apresentaram o gene *eae*. Essas cepas não apresentaram *iha* e *ehxA*, exceto aquelas com o protótipo Stx2 e a maioria daquelas com Stx2d. Em relação ao local de colheita, todas as STEC detectadas no frigorífico pertenceram a esse grupo, com exceção de uma delas. Além disso, algumas cepas também foram encontradas em fazendas. Foram encontradas duas cepas apresentando o mesmo “pulsetype” numa amostra de carcaça e numa amostra de fezes do matadouro-frigorífico (Figura 3).

Cepas de STEC *stx1*+ *stx2*+

Todas as cepas desse subgrupo apresentaram o subtipo Stx2d e a mesma variante, exceto as pertencentes ao sorogrupo O91 do “Pulsetype” 12, que apresentaram o mesmo subtipo, mas outra variante (Tabela 13 e Figura 3). A maioria das cepas mostrou padrões de virulência semelhantes e a presença de *lpfA*_{O113}, *iha* e

ehxA foi comum nesse grupo (Tabela 9). Além disso, a maioria das cepas não foi sorotipável, como a maioria das STEC desse trabalho, embora tenham sido encontrados os sorogrupos O5, O75 e O91 (Tabela 8). As cepas desse grupo foram encontradas em fazendas e no abatedouro, entretanto a maioria delas foi encontrada na fazenda 1. Algumas cepas que compartilharam os mesmo “pulsetype” foram encontradas em uma amostra fecal do matadouro frigorífico e em amostras da fazenda 1 (PT17 – Figura 3).

Cepas de STEC *stx1+* *stx2-*

Embora a maioria das cepas desse grupo tenha sido similar àquelas do grupo *stx1+* *stx2+*, muitas delas também carregaram *tsh* (Tabela 9). Elas foram detectados nas fazendas 1 e 2 e não foram tipáveis, exceto uma cepa O5 (Tabela 8).

Cepas de aEPEC e possíveis EHEC-LST

As cepas de EPEC, em geral, mostraram padrões genéticos diferentes. Essa heterogeneidade pode ser vista na Tabela 8. A presença dos genes que codificam as diferentes variantes de *lpfA* foi comum, mas não constante como em STEC (Tabela 9). Nenhuma das EPEC apresentou *bfp* e, portanto, todas foram consideradas aEPEC. Alguns isolados foram *efa1+* e *paa+*. Os genes *tsh*, *iucD* e *astA* também foram detectados (Tabela 8). Os genes *iha* e *ehxA* não foram frequentes (Tabela 9). A maioria das cepas não foi sorotipável, exceto algumas classificadas como O5, O91, O145 e O146 (Tabela 8). Oito cepas apresentando o sorogrupo O146 e o mesmo “pulsetype” foram encontradas tanto em carcaças quanto em fezes (Figura 3). Duas cepas, além de *eae*, carregavam sete genes de virulência, sendo uma pertencente ao sorogrupo O5 e o outro ao O145. Essas duas cepas mostraram características ligadas à STEC como a presença de *iha* (ambas) e pertencerem aos sorogrupos O5 e O145 respectivamente. Adicionalmente, a cepa O145 também portava o gene *lpfA*_{O157/O1-141} (Tabela 8).

VI. DISCUSSÃO

A frequência encontrada de amostras positivas para STEC em fazendas (Tabela 5) foi similar àquela observada em estudos anteriores desenvolvidos com amostras fecais de ovelhas em fazendas do Brasil e Canadá (52,1% e 50,3% respectivamente) (VETTORATO et al., 2003; FAIRBROTHER et al., 2009), entretanto foi menor que na Austrália, onde a prevalência em amostras fecais de ovinos foi 88% (FEGAN & DESMARCHÉLIER, 1999). Um relato anterior encontrou uma prevalência de STEC de 40% em cortes de carcaças ovinas (BARLOW et al., 2006), a qual é muito maior que a frequência de STEC em carcaças nesse trabalho (Tabela 7). É possível que devido ao fato do processamento de carcaças ser diferente da produção de cortes, pois nessa produção existe uma manipulação maior, as prevalências de STEC sejam diferentes ou que as diferenças nas colonizações microbianas dos animais pré-abate tenham interferido na frequência de *E. coli* nas carcaças e cortes. Considerando que ovinos infectados com ETEC geralmente apresentam diarreia (GYLES & FAIRBROTHER, 2010) e que no presente estudo a maioria dos animais analisados eram saudáveis, não é surpreendente o fato de que não tenha sido encontrada nenhuma amostra positiva para ETEC.

É interessante observar que na fazenda 3, na qual a frequência de aEPEC foi maior, a recuperação de cepas de STEC foi menor do que nas outras duas (Tabelas 5 e 6). Considerando que todas as cepas de aEPEC da fazenda 3 carregavam os genes *paa* e *tsh* (Tabela 8), pode-se supor que esses genes estejam contribuindo com a predominância de certas aEPEC em animais dessa fazenda. Um estudo recente realizado por FAIRBROTHER* demonstra que *E. coli* apresentando esses dois genes persistiram em uma população suína por vários anos, mostrando um possível papel desses genes para conferir uma melhor adaptação de determinadas cepas de *E. coli* a certas categorias de hospedeiros. O fato de todos os isolados de aEPEC da fazenda 3

* FAIRBROTHER, J. M. (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Canadá). Comunicação pessoal, 2010.

apresentaram o mesmo “pulsetype” (Tabela 12) reforça o fato de serem predominantes. Adicionalmente, esses genes estiveram presentes em cepas de aEPEC, conhecidas por produzir lesão do tipo A/E severa em suínos (BRUANT et al., 2009). Dessa forma, além de serem predominantes, essas cepas podem ser mais patogênicas.

A impossibilidade de se obter isolados de água pode ter acontecido pela baixa frequência desses patótipos na água. O volume de água dos lagos é muito grande, o que torna difícil obter os isolados, apesar do uso da membrana para concentrar as bactérias. A água dos bebedouros era tratada, o que também dificulta o isolamento. Apesar de nesse trabalho não ter sido encontrados isolados patogênicos de *E. coli* em água, casos descritos na literatura indicam que esse tipo de pesquisa deve ser continuada. Um relato anterior mostra que a água é fonte de infecção de *E. coli* que pode causar síndrome urêmica hemolítica em humanos (OGDEN et al., 2001). Além disso, outro trabalho mostra que em um surto de doenças causadas por *E. coli* O157, isolados encontrados em fezes das pessoas doentes, ovinos e água não tratada apresentaram o mesmo perfil de PFGE (LICENCE et al., 2001), demonstrando uma possível transmissão/contaminação entre ovinos, água e seres humanos.

Os isolados de STEC e aEPEC apresentaram um baixo nível de resistência aos antimicrobianos testados (Tabela 11). Um trabalho anterior realizado com amostras fecais de animais em um abatedouro na Grã-Bretanha encontrou um resultado semelhante ao desse trabalho (ENNE et al., 2008). No trabalho britânico somente cepas de *E. coli* provenientes de suínos apresentaram uma alta prevalência de resistência a antimicrobianos enquanto cepas de ovinos saudáveis foram em geral pouco resistentes. Um trabalho que avaliou STEC e *E. coli* comensal de animais mostrou que em geral STEC apresenta menores níveis de resistência do que *E. coli* comensal (BETTELHEIM et al., 2003). No trabalho citado, cepas de animais saudáveis (como as do presente trabalho) apresentaram menor resistência do que de animais doentes. Além disso, um trabalho na Espanha mostra alta resistência aos antimicrobianos em isolados de *E. coli* provenientes de ovinos doentes (CID et al., 1996). Nós não encontramos trabalhos com aEPEC de ovinos para comparações.

Os nossos resultados quando comparados aos da literatura nos leva as seguintes conclusões: 1) As cepas de ovinos saudáveis em geral oferecem menores níveis de resistência aos antimicrobianos do que as cepas de animais doentes; 2) As cepas de STEC e aEPEC aparentemente oferecem menores níveis de resistência dos que as cepas comensais; 3) Outros animais de produção apresentam níveis maiores de resistência a antimicrobianos do que ovinos.

Um possível motivo para ovinos saudáveis apresentarem cepas com pouca resistência é o fato do uso de promotores de crescimento (antimicrobianos), além de ser proibido, ser desestimulado devido a possíveis danos na microbiota ruminal, o que pode provocar perda de desempenho na produção. Quando os animais estão doentes, em geral, torna-se necessário o uso de antimicrobianos, então é natural que cepas deles provenientes apresentem um nível maior de resistência. Uma hipótese explicando o motivo pelo qual *E. coli* comensal apresenta níveis maiores de resistência do que STEC e aEPEC seria a possibilidade de algumas cepas comensais de *E. coli* serem somente microrganismos transitórios em ovinos, os quais então sofreram pressão seletiva em outros hospedeiros, enquanto muitas cepas de STEC e aEPEC podem ser verdadeiros habitantes da microbiota intestinal de ovinos saudáveis, e dessa forma sofreriam uma menor pressão seletiva.

Entre as cepas isoladas de STEC e aEPEC, a maioria foi sorologicamente não-tipável (75,3%), o que indica que ou elas são não tipáveis ou pertencem a sorogrupos que não foram testados. Os sorogrupos encontrados nas STEC (O5, O75, O91) também foram encontrados em fezes de ovinos em outro trabalho feito no Estado de São Paulo, no qual após as cepas não-tipáveis, os sorogrupos O5 e O75 foram os mais prevalentes (VETTORATO et al., 2009). Na Espanha (BLANCO et al., 2003) e Austrália (BARLOW et al., 2006), os três sorogrupos citados foram encontrados em STEC de origem fecal ovina, mas somente O91 foi relatado como bem prevalente. Além disso, os sorogrupos O5 e O91 foram os mais prevalentes em STEC de origem fecal ovina na Alemanha (BEUTIN et al., 1993) e Canadá (FAIRBROTHER et al., 2009). Assim, embora as STEC de origem fecal ovina compartilhem alguns sorogrupos no mundo

inteiro, a prevalência de cada um deles pode ser influenciada por algum componente geográfico ou particularidades referentes ao manejo de cada criação.

As cepas de STEC *stx1*- *stx2*+, desse trabalho, além de serem heterogêneas, foram aquelas com maior potencial zoonótico (Tabela 14). Embora em geral, a maioria das STEC relacionadas à HUS seja capaz de produzir intimina, em um trabalho anterior foi mostrado que a maioria das *E. coli* associadas a HUS e BD não tinham os genes *eae* e *stx1*, mas carregavam *Stx2_{dact}* (BIELASZEWSKA et al., 2006), um perfil também encontrado nesse trabalho (Isolados 63R-A, 86R-C – “Pulsetype” 43, Tabelas 8 e 12). Além disso, uma cepa encontrada no presente trabalho apresentou o protótipo *Stx2* (também conhecido como *Stx2a*), o qual foi relacionado à HUS e BD (Isolado 324A-1 – “Pulsetype” 42, Tabelas 12 e 13) (FRIEDRICH et al., 2002; PERSSON et al., 2007). Pelo fato desse grupo de STEC ter sido predominante no matadouro-frigorífico, o seu potencial zoonótico é reforçado, pois as cepas desse grupo podem ter maiores oportunidades de entrar na cadeia alimentar de seres humanos. Um trabalho anterior mostra que a linha de abate foi a fonte mais importante de contaminação por *Salmonella* em carcaças suínas (SWANENBURG et al., 2001) indicando uma tendência do matadouro-frigorífico atuar como reservatório ambiental de bactérias nocivas. Não é, portanto, inesperado o mesmo acontecer com *E. coli* na linha de abate de ovinos. Também é interessante observar que STEC muito semelhante a esse subgrupo (*Stx2_{dact}*+, *stx1*-, *eae*-, *ehxA*- e *saa*-) já foi isolada de amostras fecais de um matadouro-frigorífico na Suíça (TASARA et al., 2008), de forma que esse perfil pode ser encontrado em matadouro-frigoríficos de diferentes países.

Tabela 14. Cepas de *E. coli* com potencial zoonótico encontrada nesse trabalho.

Cepa(s)	"Pulsetype"	Patótipo	Justificativa	Referência
63R-A 86R-C	PT43	STEC	Presença de <i>stx2_{dact}</i> , ausência <i>stx1</i> e <i>eae</i> . Cepas encontradas no matadour-frigorífico	(BIELASZEWSKA et al., 2006)
324A-1	PT42	STEC	Presença do protótipo <i>stx2</i> (<i>stx2a</i>)	(FRIEDRICH et al., 2002; PERSSON et al., 2007)
264A-1 275B-10	PT12	STEC	Sorogrupo O91, combinação de genes encontrada previamente em cepas patogênicas, pertence ao soropatotipo C da classificação de Karmali	(WILLSHAW et al., 1992; KARMALI et al., 2003; COOKSON et al., 2007)
108B-4	PT21	STEC	Sorogrupo O5, previamente encontrado em caso de HUS associada a ovinos	(STARR et al., 1998)
112A-1	PT22	STEC	Sorogrupo O5, previamente encontrado em caso de HUS associada a ovinos	(STARR et al., 1998)
181A-2	PT23	STEC	Sorogrupo O5, previamente encontrado em caso de HUS associada a ovinos	(STARR et al., 1998)
48C-A	PT01	aEPEC	Presença de <i>efa1</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA_{O113}</i> e <i>paa</i>	(AFSET et al., 2006; NARIMATSU et al., 2010)
258A-1	PT08	aEPEC	Sorogrupo O145. Presença de <i>efa1</i> , <i>ehxA</i> e <i>paa</i> . Presença de <i>lpfA_{O157/O1-141}</i>	(TOMA et al., 2004; AFSET et al., 2006; COOKSON et al., 2007; AFSET et al., 2008; BIELASZEWSKA et al., 2008; NARIMATSU et al., 2010)

No presente trabalho foi detectado o subtipo Stx2e (“pulsetypes” 45-48, Tabela 13), o qual é comumente ligado à doença do edema em suínos (MOXLEY, 2000), mas que também já foi encontrado em amostras ambientais e fezes de gado de leite (VERNOZY-ROZAND et al., 2004) ou alimentos (BEUTIN et al., 2007; SLANEC et al., 2009). De acordo com a literatura pesquisada, esse parece ser o primeiro relato de Stx2e em ovinos. Considerando que na fazenda que originou uma dessas cepas existe uma criação de suínos próxima da criação de ovinos é possível que tenha havido uma transmissão de suíno para ovino. O alto grau de similaridade entre os “pulsetypes” (>90%) indica que as cepas têm origem clonal comum.

Pequenas modificações nas subunidades A e B de Stx2 foram relatadas previamente (SLANEC et al., 2009), o que corrobora o fato de nesse trabalho terem sido detectadas cepas carreando subunidades relacionadas a variantes distintas de Stx2 (“pulsetypes” 37,38, 49 e 43, Tabela 13). Uma vez que as toxinas Stx2 que albergam subunidades A e B relacionadas a duas variantes distintas e já conhecidas, não estão cobertas pelo novo sistema de classificação, nesse trabalho optou-se por se adaptar o novo sistema, nomeando as variantes nessa situação usando-se ambos os subtipos. As novas variantes restantes (“pulsetypes” 44 e 45) foram nomeadas com base no novo sistema de classificação.

A maior parte das cepas isoladas do patotipo STEC desse trabalho apresentou *stx1* e *stx2* e mostrou um perfil de genes de virulência semelhante. Dentro dessa categoria (*stx1+*, *stx2+*), as cepas do sorogrupo O91 (264A-1 e 275B-10, “pulsetype”12, Tabelas 8 e 12) aparentam ter potencial zoonótico (Tabela 14). Três fatos reforçam esta hipótese: (1) esse sorogrupo foi identificado em isolados humanos que apresentaram *stx* e não apresentaram *eae* (COOKSON et al., 2007), (2) um estudo anterior encontrou uma cepa O91:H- semelhante aos isolados do “Pulsetype” 12 (*stx1+*, *stx2+* e *ehxA-*) que foi originada de uma caso clínico de diarreia e BD (WILLSHAW et al., 1992), (3) isolados O91:H21 do soropatotipo C da classificação de Karmali apresentaram *stx* na ausência de *eae* e *efa1*. O soropatotipo C raramente é envolvido em surtos, mas é associado a HUS e BD (KARMALI et al., 2003). Além disso, em um estudo anterior, um

isolado de STEC O5 (sorogrupo que também foi encontrado em cepas de STEC nesse trabalho - 108B-4,112A-1, 181A-2, “pulsetypes” 21, 22 e 23 – Tabelas 8 e 12) foi recuperado de um caso de HUS e teve um “pulsetype” similar em comparação a um isolado ovino (STARR et al., 1998), demonstrando que STEC O5 relacionada a essa grave doença pode colonizar ovinos (Tabela 14).

De forma similar ao que foi encontrado nesse trabalho (Tabela 9), relatos anteriores apontam uma alta prevalência dos genes *lpfA*_{O113} e *iha* em STEC de diferentes fontes, (TOMA et al., 2004; CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; GALLI et al., 2010; WU et al., 2010). Diferentemente do que foi encontrado em trabalhos anteriores (PATON et al., 2001; CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; VU-KHAC & CORNICK, 2008; VETTORATO et al., 2009), não foi encontrada uma correlação entre *ehxA* e *saa* em cepas de STEC nesse trabalho (Tabela 8), sendo então provável que o gene *saa* não esteja localizado no mesmo plasmídio que *ehxA*.

Em trabalhos realizados na Suíça e no Brasil (FROHLICHER et al., 2008; VETTORATO et al., 2009), os quais detectaram aEPEC em fezes de ovinos, diferentemente desse estudo, a maioria das aEPEC foram tipáveis. O sorogrupo O146 foi prevalente em ambos os trabalhos citados, assim como no presente trabalho. O sorogrupo O145 também foi encontrado nesse trabalho e nos trabalhos citados, mas não de forma tão prevalente quanto O146. aEPEC O125 já foi isolada de humanos e gatos no Brasil (MOURA et al., 2009). Baseado na literatura consultada este parece ser o primeiro relato dos sorogrupos O5 e O125 em aEPEC de ovinos.

Algumas cepas de aEPEC isoladas nesse trabalho podem ter potencial zoonótico (Tabela 14). Pode ser visto nas Tabelas 8 e 9 que elas apresentaram genes usualmente contidos em cepas de *E. coli* associadas a diarreia em humanos como *efa1* (AFSET et al., 2006; NARIMATSU et al., 2010), *ehxA*, *lpfA*_{O113} e *paa* (AFSET et al., 2006). Duas dessas cepas se destacam e podem ter maior potencial zoonótico. Uma pertencente ao sorogrupo O5 (48C-A, Tabela 8) apresentou todos os genes citados acima e a cepa O145 (258A-1 Tabela 8) apresentou quase todos os genes citados e

também genes como *lpfA*_{O157/O1-141} e *toxB*. Esses últimos genes já foram detectados previamente em sorogrupos de STEC ligados a HUS (TOMA et al., 2004). Além disso, *E. coli* O145 sem o gene *stx* mas com o gene *eae* já foi isolada de pessoas com diarreia e BD (COOKSON et al., 2007; AFSET et al., 2008; BIELASZEWSKA et al., 2008).

Um estudo anterior sugere que algumas aEPEC podem ser EHEC que perderam *stx* e dessa forma são denominadas EHEC-LST (BIELASZEWSKA et al., 2008). Nesse trabalho, as cepas de aEPEC com potencial zoonótico O5 e O145 (48C-A e 258A-1, Tabela 8) apresentaram algumas características demonstrando que são possíveis EHEC-LST. Por exemplo, o sorogrupo ao qual eles pertencem é encontrado em STEC. Outra evidência é que o gene *iha*, nesse trabalho, foi relacionada majoritariamente às cepas de STEC e entre todas as aEPEC, somente essas duas apresentaram esses genes. Outros trabalhos também mostram que o gene *iha* é muito prevalente em STEC (TOMA et al., 2004; CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; WU et al., 2010). Adicionalmente, a cepa O145 apresentou o gene *lpfA*_{O157/O1-141}, que em um trabalho anterior foi encontrado somente em STEC dos sorogrupos O157 e O145 (TOMA et al., 2004). Esses dois isolados foram as únicas aEPEC que apresentaram *iucD*, o que reforça a hipótese delas serem diferentes dos demais isolados de aEPEC desse trabalho.

Em relação ao PFGE, os resultados demonstram uma alta variabilidade epidemiológica entre as cepas de STEC e aEPEC (Figura 3). Em geral, os “pulsetypes” ficaram restritos ao mesmo local de colheita, embora tenham existido exceções. De forma similar, um trabalho anterior mostrou uma grande heterogeneidade em STEC ovina baseada na PFGE (VETTORATO et al., 2009). Em relação à aEPEC, um estudo com amostras humanas também mostrou alta variabilidade entre os “pulsetypes” (AFSET et al., 2008) enquanto outro com amostras de origem diversa mostrou uma variabilidade menor (MOURA et al., 2009). É importante observar que esse segundo estudo foi realizado com muitos isolados pertencentes ao mesmo sorogrupo, o que pode favorecer o aparecimento dos mesmos “pulsetypes”.

É interessante notar que no presente trabalho o mesmo “pulsetype” foi encontrado em duas cepas de STEC e oito de aEPEC oriundas de amostras de fezes e carcaças, indicando uma contaminação fecal das carcaças. Essa provável contaminação das carcaças é de interesse em saúde pública.

Em síntese, esse trabalho mostrou similaridades na frequência de STEC e diferenças na frequência de EPEC entre as diferentes fazendas que foram amostradas. As cepas de aEPEC e STEC de ovinos apresentaram adesinas putativas e também genes relacionados a ExPEC. Ainda em relação à presença de genes de virulência, as cepas de STEC apresentaram maior ou menor heterogeneidade, dependendo da combinação de *stx*, enquanto as aEPEC foram mais homogêneas. Ademais, alguns isolados apresentaram novas variantes de Stx2 e também variantes já conhecidas, inclusive o subtipo Stx2e, que é relacionado à doença do edema em suínos. Algumas cepas apresentaram potencial zoonótico, notadamente as STEC *stx1-*,*stx2+* e algumas aEPEC contendo genes que codificam certas adesinas. Além disso, duas das aEPEC são candidatas a serem classificadas como EHEC que perderam *stx*.

VII. CONCLUSÕES

1. A frequência de STEC aparenta ser constante entre diferentes fazendas de ovinos enquanto a frequência de EPEC é variável. A frequência de STEC e EPEC no matadouro-frigorífico de ovinos é variável, provavelmente devido a particularidades de cada lote abatido. ETEC provavelmente não faz parte da microbiota de ovinos saudáveis, pois não foi encontrada.
2. Cepas de STEC e EPEC de ovinos apresentaram diversos genes de virulência, alguns deles as conferindo um potencial zoonótico. Ainda em relação a esses genes, em ovinos, as STEC aparentam serem mais ou menos heterogêneas, dependendo da combinação de *stx*, por outro lado, as EPEC parecem ser mais homogêneas. O resultado da sorologia de STEC de ovinos demonstrou que alguns sorogrupos são comuns em diversos países. As características bioquímicas não trouxeram novas informações, pois a maioria dos isolados apresentaram padrões fenotípicos regulares. Os testes de resistência a antimicrobianos confirmaram que muitas vezes cepas de *E. coli* provenientes de animais saudáveis apresentam baixo nível de resistência. A subtipagem de Stx2 mostrou e forma inédita que ovinos podem apresentar o subtipo Stx2e, o qual é associado a suínos, essa análise também evidenciou, de forma adicional, potencial zoonótico em algumas cepas de STEC. A análise de similaridade mostrou que provavelmente existem poucos clones prevalentes nas *E. coli* de ovinos, pois os diferentes "Pulsetypes" ficaram em geral restritos aos locais de coletas, com poucas exceções, então, as STEC e EPEC de ovinos têm em muitas vezes origem clonal diversa. Além disso, essa análise mostrou que existe contaminação fecal nas carcaças de ovinos. Os resultados também mostram que ovinos são colonizados por prováveis cepas de EHEC-LST, pois duas cepas, candidatas a se situar nessa categoria, foram encontradas nesse trabalho.

VIII. REFERÊNCIAS

ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A. M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M. O.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 397-406, 2008.

AFSET, J.; 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.

AFSET, J.; ANDERSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2280 - 2290, 2008.

AN, H.; FAIRBROTHER, J. M.; DÉSAUTELS, C.; MABROUK, T.; DUGOURD, D.; DEZFULIAN, H.; HAREL, J. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, n. 5, p. 291-300, 2000.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: American Public Health Association, 2005. p.

BARLOW, R. S.; GOBIUS, K. S.; DESMARCHELIER, P. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-5, 2006.

BATISSON, I.; GUIMOND, M.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516 - 4525, 2003.

BEAUDRY, M.; ZHU, C.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 144-148, 1996.

BETTELHEIM, K. A.; HORNITZKY, M. A.; DJORDJEVIC, S. P.; KUZEVSKI, A. Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 155-162, 2003.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, 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.

BEUTIN, L.; MIKO, A.; KRAUSE, G.; PRIES, K.; HABY, S.; STEEGE, K.; ALBRECHT, N. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4769-4775, 2007.

BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; TARR, P. I.; SONNTAG, A.-K.; KARCH, H. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM:

Secular and geographic consistency of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4225-4228, 2005.

BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, ALEXANDER W.; ALDICK, T.; SCHÜRK-BULGRIN, R.; KARCH, H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: Predictor for a severe clinical outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 9, p. 1160-1167, 2006.

BIELASZEWSKA, M.; MIDDENDORF, B.; KOCK, R.; FRIEDRICH, A.; FRUTH, A.; KARCH, H.; SCHMIDT, M.; MELLMANN, A. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 208 - 217, 2008.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671-676, 2011.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; DAHBI, G.; GONZALEZ, E. A.; BERNARDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1351-1356, 2003.

BONNET, R.; SOUWEINE, B.; GAUTHIER, G.; RICH, C.; LIVRELLI, V.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1777-1780, 1998.

BROES, A.; FAIRBROTHER, J. M.; MAINIL, J.; HAREL, J.; LARIVIERE, S. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O8:KX105 and O8:K"2829" strains isolated from piglets with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2402-2409, 1988.

BRUANT, G.; ZHANG, Y.; GARNEAU, P.; WONG, J.; LAING, C.; FAIRBROTHER, J.; GANNON, V.; HAREL, J. Two distinct groups of porcine Enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serogroup O45 are revealed by comparative genomic hybridization and virulence gene microarray. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 402, 2009.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; DOS SANTOS, L. F.; IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; BERGAMINI, A. M. M.; GUTH, B. E. C. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, n. 2, p. 329-334, 2007.

CHAPMAN, P. A.; CERDÁN MALO, A. T.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; HARKIN, M. A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 139-150, 2001.

CID, D.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; RUÍZ SANTA QUITEIRA, J.; DE LA FUENTE, R.; BLANCO, J. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic goat kids in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 3-4, p. 349-354, 1996.

CID, D.; SANZ, R.; MARIN, I.; DE GREVE, H.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; AMILS, R.; DE LA FUENTE, R. Characterization of nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1370-1375, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, CLSI document M100-S17**. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2007. 179 p.

_____. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals, CLSI document M31-A3**. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2008. 116 p.

COGGAN, J. A.; MELVILLE, P. A.; OLIVEIRA, C. M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A. M.; BENITES, N. R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 477-483, 2008.

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.

COOKSON, A. L.; CAO, M.; BENNETT, J.; NICOL, C.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G. T. Relationship between virulence gene profiles of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and sheep in New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 7509-7513, 2010.

CORNICK, N. A.; HELGERSON, A. F.; MAI, V.; RITCHIE, J. M.; ACHESON, D. W. K. In Vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5086-5088, 2006.

DAIGLE, F.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M. Expression and detection of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli* **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 286-291, 1994.

DJORDJEVIC, S. P.; HORNITZKY, M. A.; BAILEY, G.; GILL, P.; VANSELOW, B.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K. A. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 2017-2021, 2001.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R.; HARTLAND, E. 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, p. 6761 - 6769, 2002.

DOZOIS, C.; DHO-MOULIN, M.; BREE, A.; FAIRBROTHER, J.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145 - 4154, 2000.

DUFFY, L. L.; SMALL, A.; FEGAN, N. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* serotypes in sheep during slaughter at two Australian abattoirs. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 10, p. 399-404, 2010.

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.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIELING, S.; ALT, K.; ANTÁO, E.-M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H.-C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FAIRBROTHER, J. M.; MARTINEZ, G.; LEMOINE, M. Prevalence of serovirotypes of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in healthy sheep in Québec In: 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia coli* Infections, 2009. Buenos Aires, Argentina.

FEGAN, N.; DESMARCHELIER, P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in eastern Australia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 335-339, 1999.

FRIEDRICH, ALEXANDER W.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W. L.; PULZ, M.; KUCZIUS, T.; AMMON, A.; KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 74-84, 2002.

FROHLICHER, E.; KRAUSE, G.; ZWEIFEL, C.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 144, 2008.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; LÜTHY, J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 31-34, 1990.

GALLI, L.; MILIWEBSKY, E.; IRINO, K.; LEOTTA, G.; RIVAS, M. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)

strains isolated from cattle and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2-4, p. 307-313, 2010.

GOBIUS, K. S.; HIGGS, G. M.; DESMARCHELIER, P. M. Presence of activatable shiga toxin genotype (*stx2d*) in Shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3777-3783, 2003.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13 suppl, p. E45-E62, 2007.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G. ; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010. p.267-308.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; NEILANDS, J. B. Nucleotide sequence of the *iucD* gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *lacZ* gene fusions. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 56-64, 1988.

HIGGINS, L. M.; FRANKEL, G.; CONNERTON, I.; GONÇALVES, N. S.; DOUGAN, G.; MACDONALD, T. T. Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. **Science**, v. 285, n. 5427, p. 588-591, 1999.

IMBERECHTS, H.; DE GREVE, H.; SCHLICKER, C.; BOUCHET, H.; POHL, P.; CHARLIER, G.; BERTSCHINGER, H.; WILD, P.; VANDEKERCKHOVE, J.; VAN DAMME, J. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes

edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 5, p. 1963-1971, 1992.

KAPER, J. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 130-133, 1996.

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

KARMALI, M.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 4930 - 4940, 2003.

KUDVA, I.; HATFIELD, P.; HOVDE, C. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 431-433, 1996.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1189-1193, 1992.

LICENCE, K.; OATES, K. R.; SYNGE, B. A.; REID, T. M. S. 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, p. 135-138, 2001.

LORTIE, L. A.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 656-659, 1991.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria** Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312 p.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTE, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7399-7408, 2009.

MOXLEY, R. A. Edema disease. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 16, n. 1, p. 175-185, 2000.

NARIMATSU, H.; OGATA, K.; MAKINO, Y.; ITO, K. Distribution of non-Locus of Enterocyte Effacement pathogenic island-related genes in *Escherichia coli* carrying *eae* from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4107-4114, 2010.

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

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPLEYARD, G.; MIDDLETON, D.; FAIRBROTHER, J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 242-252, 2003.

NICHOLLS, L.; GRANT, T.; ROBINS-BROWNE, R. 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.

OGDEN, I. D.; FENLON, D. R.; VINTEN, A. J. A.; LEWIS, D. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, n. 1–2, p. 111-117, 2001.

OSÉS, S. M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Prevalence and quantification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* along the lamb food chain by quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. Supplement 1, p. S163-S169, 2010.

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 toxigenic *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, J.; PATON, A. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *E. coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450 - 479, 1998.

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P.; ETHELBERG, S.; SCHEUTZ, F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2020-2024, 2007.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941 T^{AL}. In: GARRITY, G.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R. ; STALEY, J. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**. 2 ed. New York: Springer, v.2, 2005. p.607-625.

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 *sefC* in Locus of Enterocyte Effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6863-6873, 2001.

SCHMIDT, M. A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 1544-1552, 2010.

SLANEC, T.; FRUTH, A.; CREUZBURG, K.; SCHMIDT, H. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6187-6197, 2009.

STARR, M.; BENNETT-WOOD, V.; BIGHAM, A. K.; KONING-WARD, T. F. D.; BORDUN, A. M.; LIGHTFOOT, D.; BETTELHEIM, K. A.; JONES, C. L.; ROBINS-BROWNE, R. M. Hemolytic-Uremic Syndrome following Urinary Tract Infection with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 310-315, 1998.

SUMNER, J.; PETRENAS, E.; DEAN, P.; DOWSETT, P.; WEST, G.; WIERING, R.; RAVEN, G. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 255-260, 2003.

SWANENBURG, M.; BERENDS, B.; URLINGS, H.; SNIJDERS, J.; KNAPEN, F. V. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 114, n. 9-10, p. 356-359, 2001.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÉRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence in 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.

TAKEUCHI, A.; INMAN, L. R.; O'HANLEY, P. D.; CANTEY, J. R.; LUSHBAUGH, W. B. Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. **Infection and Immunity**, v. 19, n. 2, p. 686-694, 1978.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

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.

TASARA, T.; BIELASZEWSKA, M.; NITZSCHE, S.; KARCH, H.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Activatable Shiga toxin 2d (Stx2d) in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 199-204, 2008.

TENNANT, S.; TAUSCHEK, M.; AZZOPARDI, K.; BIGHAM, A.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E.; QI, W.; WHITTAM, T.; ROBINS-BROWNE, R. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 117, 2009.

TOMA, C.; MARTINEZ ESPINOSA, E.; 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*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 4937-4946, 2004.

TOTH, I.; HERAULT, F.; BEUTIN, L.; OSWALD, E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4285-4291, 2003.

TRABULSI, L.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 508 - 513, 2002.

VERNOZY-ROZAND, C.; MONTET, M. P.; BERTIN, Y.; TRABLY, F.; GIRARDEAU, J. P.; MARTIN, C.; LIVRELLI, V.; BEUTIN, L. Serotyping, stx2 subtyping, and characterization of the Locus of Enterocyte Effacement Island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2556-2559, 2004.

VETTORATO, M. P.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 1-2, p. 103-109, 2003.

VETTORATO, M. P.; DE CASTRO, A. F. P.; CERGOLE-NOVELLA, M. C.; CAMARGO, F. L. L.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy sheep of different populations in São Paulo, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 53-59, 2009.

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.; CORNICK, N. A. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 356-363, 2008.

WANI, S. A.; HUSSAIN, I.; FAYAZ, I.; MIR, M. A.; NISHIKAWA, Y. Subtype analysis of *stx1*, *stx2* and *eae* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 489-490, 2009.

WILLSHAW, G.; SCOTLAND, S.; SMITH, H.; ROWE, B. Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. **The Journal of infectious diseases**, v. 166, n. 4, p. 797-802, 1992.

WOODWARD, M. J.; CARROLL, P. J.; WRAY, C. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 2-3, p. 251-261, 1992.

WU, X.-Y.; CHAPMAN, T.; TROTT, D. J.; BETTELHEIM, K.; DO, T. N.; DRIESEN, S.; WALKER, M. J.; CHIN, J. Comparative Analysis of Virulence Genes, Genetic Diversity,

and Phylogeny of Commensal and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Weaned Pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 83-91, 2007.

WU, Y.; HINENOYA, A.; TAGUCHI, T.; NAGITA, A.; SHIMA, K.; TSUKAMOTO, T.; SUGIMOTO, N.; ASAKURA, M.; YAMASAKI, S. Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 5, p. 589-597, 2010.