

VASCO TÚLIO DE MOURA GOMES

**Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli*
associadas à doença do edema em suínos**



São Paulo
2012

VASCO TÚLIO DE MOURA GOMES

**Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas
à doença do edema em suínos**

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2743
FMVZ

Moura, Gomes, Vasco Túlio de
Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à doença do edema em suínos / Vasco Túlio de Moura Gomes. -- 2012.
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Escherichia coli*. 2. Doença do edema. 3. Suíno. 4. PFGE. 5. AFLP. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Comparação entre os perfis plasmidiais de cepas de *Escherichia coli* isoladas do ciclo de produção suína carregando genes de resistência a cefalosporinas e quinolonas”, protocolado sob o nº 2572/2012, utilizando 100 (cem) suínos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research “Plasmidial profile comparison in *Escherichia coli* strains isolated from commercial swine sources harboring resistance genes to cephalosporins and quinolones”, protocol number 2572/2012, utilizing 100 (one hundred) pigs, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOMES, Vasco Túlio de Moura

Título: Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas á
doença do edema em suínos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada
às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Carlos e Márcia,
por tudo que fizeram para
proporcionar essa minha
conquista

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos e ao Marcos que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todas as decisões da minha vida, que me inspiram a seguir em frente sempre.

Agradeço a professora Dra. Andrea Micke Moreno pela confiança, ensinamentos, disponibilidade, pelas palavras e paciência depositada ao longo do trabalho. Serei eternamente grato, não sei nem como agradecer.

Aos meus professores da PUC Minas, Dra. Andrea Rentz Ribeiro e Dr. Carlos Henrique Cabral Viana pelo incentivo em seguir a área da pesquisa. Em especial, agradeço a minha amiga Larissa Vasco de Abreu.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Sanidade Suína que me ajudaram: Maria Roberta Felizardo, Barbara Letícia Costa, Marina Moreno, Pedro Henrique Filsner, Debora Gobbi, Gabriela Oliveira, Mirela Vilela, Margot Berrezaie, Laura Tugwell, Fabiana Miraglia, Thais Ferreira, Givago Faria, Cristina Roman Amigo, Ketrin Silva, Cleise Ribeiro e Maria Spindola.

Aos técnicos do Laboratório de Sanidade Suína pela total atenção: Ana Paula Santos Silva, Alexandre Sanches, Jucélia Pereira e Maria José.

Aos professoras, funcionários e colegas do VPS.

À FAPESP pelo período de bolsa concedida e realização deste trabalho.

Aos meus amigos Camila Nóia Agunso, Silvio Grenfell, Kênia Cristina, Joana Meirelles, Bruna Barbosa.

RESUMO

GOMES, V. T. M. **Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à doença do edema em suínos.** [Genotypic and phenotypic characterization of *E. coli* associated to edema disease in swine]. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A doença do edema afeta os leitões desmamados e é causada por cepas de *Escherichia coli* adaptadas ao hospedeiro e produtoras da toxina Stx_{2e}. A doença do edema é caracterizada por edema de pálpebras, ataxia, pedlagem, dificuldade locomotora, e morte súbita. No presente estudo foram avaliadas 158 cepas de *E. coli* positivas para presença do gene codificador da toxina Stx_{2e} isoladas de 62 animais provenientes de 13 granjas localizadas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Goiás e Minas Gerais. As cepas foram submetidas a determinação do perfil de resistência, caracterização dos genes de virulência, determinação do grupo filogenético, expressão da toxina em cultivos de célula Vero, caracterização genotípica através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados com uma única enzima (SE-AFLP). Dentre as 158 cepas stx_{2e}⁺ foram identificadas 83,5% (132/158) apresentando resistência a três classes de antimicrobianos ou mais. Altos níveis de resistência foram identificados contra tetraciclina, sulfonamidas e florfenicol. A frequência dos genes de virulência associados a doença do edema como a fímbria F18, por exemplo, foi baixa em relação a outros estudos. Todas as 158 cepas testadas apresentaram a expressão da toxina e efeito citotóxico em células Vero. A caracterização dos grupos filogenéticos permitiu a distribuição das cepas nos quatro grupos descritos a seguir: grupo A 27,2% (43/158), grupo B1 3,8% (6/158), grupo B2 39,2% (62/158) e grupo D 29,8% (47/158). As cepas foram caracterizadas através da PFGE e do SE-AFLP e ambas as técnicas apresentaram altos índices discriminatórios (0,98 e 0,99 respectivamente). A associação mais frequente nas duas técnicas genotípicas foi observada em relação ao animal e a granja de origem. Apesar de pertencerem a um patotipo definido (STEC) e de serem altamente especializadas em relação ao hospedeiro, o suíno, foi observada uma grande variabilidade genética e de perfis de resistência entre as cepas de *E. coli* estudadas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Doença do edema. Suíno. PFGE. AFLP.

ABSTRACT

GOMES, V. T. M. **Genotypic and phenotypic characterization of *E. coli* associated to edema disease in swine.** [Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à doença do edema em suínos]. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Edema disease affects weaning piglets and is caused by a host adapted *Escherichia coli* and producer of Stx2e toxin. The edema disease is characterized by swollen eyelids, ataxia, recumbence, convulsions, paralysis, or sudden death. In the present study were evaluated 158 *E. coli* strains Stx2e toxin gene positive isolated from 62 animals, from 13 swine herds located at Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Goiás and Minas Gerais States. Strains were submitted to resistance profile determination, virulence genes detection, phylogenetic group characterization, toxin expression in Vero cell culture, genotypic characterization through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and single enzyme amplified fragments length polymorphism (SE-AFLP). Among the 158 strains *stx2_e* were identified 83.5% (132/158) resistant to more than three or more classes of antimicrobials, High levels of resistance were found against tetracycline, sulfonamide and florfenicol. The frequency of virulence genes associated to edema disease as F18 fimbriae, for example, was low in relation to other studies. All 158 tested strains presented Stx2e toxin expression and cytotoxic effect in Vero cell culture. The characterization of phylogenetic groups permitted the distribution of strains in four groups described as follow: group A 27.2% (43/158), group B1 3.8% (6/158), group B2 39.2% (62/158) and group D 29.8% (47/158). The strains were characterized through PFGE and the SE-AFLP, and both techniques presented high discriminatory index (0.98 and 0.99 respectively). The association more frequently in both techniques was observed in relation to animal and herd origin. Despite to belong to one defined pathotype (STEC) and to be highly specialized in relation to host, the swine, it was observed a high variability of genetic and resistance profile among tested *E. coli*.

Key words: *Escherichia coli*. Edema disease. Swine. PFGE. AFLP.

SUMÁRIO

1 ... INTRODUÇÃO	8
2 ... REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. ETIOLOGIA	9
2.2. INFECÇÕES EM SUÍNOS	13
2.3. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE	14
3. .. OBJETIVOS	17
4. .. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. AMOSTRAS	18
4.2. ISOLAMENTO E REPIQUE DAS CEPAS	18
4.3. PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA	19
4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS ATRAVÉS DA PCR	19
4.5 . CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> SEGUNDO OS GRUPOS FILOGENÉTICOS	21
4.6. ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	22
4.7. POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTO AMPLIFICADOS (AFLP)	23
4.8. DETERMINAÇÃO DA AÇÃO DA TOXINA Stx2e EM LINHAGENS DE CÉLULA VERO	24
4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS	26
5. .. RESULTADOS	27
6. .. DISCUSSÃO	42
7. .. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura nacional, assim como todo o setor de agroindústrias, representa uma grande fonte de divisas para o país e tem uma importante colaboração no estabelecimento de um saldo positivo na balança comercial. Dentro deste contexto, as infecções por *Escherichia coli* causam graves prejuízos à indústria suinícola devido à redução do desempenho de crescimento e mortalidade, com conseqüente queda de produtividade.

A presença de genes codificadores dos fatores de virulência está diretamente envolvida com os mecanismos de patogenicidade das cepas de *E. coli*. Alguns destes fatores de virulência como a toxina Stx2e estão relacionados a surtos com grande impacto nas taxas de mortalidade na fase de creche. Em alguns locais do país o uso constante de antimicrobianos tem feito com que os quadros de doença do edema geralmente restritos a animais de creche, ocorram mais tardiamente, nas fases de crescimento e terminação, levando a prejuízos ainda maiores devido à mortalidade. Nestes surtos, observa-se ainda a alta frequência de isolados multirresistentes.

Apesar de sua grande ocorrência no Brasil, a epidemiologia da infecção por *E. coli* positiva para Stxe2 e estudos envolvendo a caracterização molecular e as características de resistência a antimicrobianos destas cepas tem sido pouco estudadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A doença do edema é uma doença que afeta os leitões desmamados e é causada por cepas de *Escherichia (E.) coli* adaptadas ao hospedeiro e que produzem a verotoxina 2e (VT2e) também descrita como Shiga2e (Stx2e). (PATON; PATON, 1998).

Os sinais clínicos da doença do edema incluem inchaço das pálpebras, sintomas neurológicos como ataxia, pedalagem, dificuldade locomotora, e morte súbita. Os lotes afetados pela doença do edema frequentemente apresentam diarreia. Estas cepas de *E. coli* colonizam o trato intestinal (íleo) através da ação da fímbria F18 que é específica para os suínos. Muitos isolados causadores da doença do edema também produzem enterotoxinas termoestáveis e termolábeis (WRAY; WOODWARD, 1997).

Historicamente a doença do edema tem sido relacionada a cepas dos sorotipos O138, O139 e O141. Evidências sugerem que estas cepas possam ser transmitidas aos leitões tanto pela fêmea suína quanto pelo ambiente. Uma vez que o microrganismo está no ambiente em que os animais são criados torna-se muito difícil sua eliminação e o mesmo pode ser transmitido entre as diferentes fases da produção e de um rebanho para outro (GARABAL et al., 1996; AARESTRUP et al., 1997).

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, da qual compreende cinco espécies, designadas: *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*, sendo que a espécie de maior importância é *Escherichia coli* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Este microrganismo (*E. coli*) foi primeiramente descrito pelo pediatra e bacteriologista alemão Theodor Escherich (1857-1911) em neonatos. São bactérias gram-negativas não esporuladas, anaeróbias facultativas, apresentam-se como

bastonentes móveis com flagelos peritríquios ou imóveis, e produtores de catalase (FAIRBROTHER, 1992; GYLES, 1994).

A espécie *E. coli*, além de ser um habitante comensal do trato gastrointestinal de humanos e animais, está associada a infecções intestinais e extraintestinais. É um dos principais agentes infecciosos nos quadros de diarreias em leitões e gerando perdas importantes ao setor no período de lactação e após o desmame (LEVINE, 1987; IMBERECHTS; GREVE; LINTERMANS, 1992; BRITO; TAGLIARI, 2000; CALDERARO et al., 2001; SMITH; FRATAMICIO; GUNTHER, 2007).

Na etiologia das infecções por *E. coli*, denominadas colibaciloses, estão envolvidos inúmeros sorogrupos. Os principais antígenos foram caracterizados através de métodos sorológicos em: antígeno somático (O), lipopolissacarídeo presente na cápsula bacteriana; antígeno capsular (K), polissacarídeo presente na cápsula bacteriana e antígeno flagelar (H), uma proteína constituinte do flagelo (MACKINNON, 1997). Porém nem todas as cepas de *E. coli* apresentam os três tipos de antígenos simultaneamente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005)

Cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia pós desmame pertencem tipicamente aos sorogrupos O8, O141 e O149 e são hemolíticas (NIEWERTH et al., 2001); estas colonizam o intestino delgado através de fatores específicos de adesão (fímbrias) e produzem uma ou diversas exotoxinas responsáveis pela doença (FRYDENDAHL, 2002).

As adesinas fimbriais mediam a fixação da bactéria à superfície das células epiteliais do hospedeiro e iniciam a colonização bacteriana (ZHANG et al., 2007). Em suínos as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987p), F41 estão relacionadas com distúrbios entéricos na fase de lactação e as fímbrias F4 (K88) e F18 (F107) com os quadros de enterite ou doença do edema na fase pós-desmame. Determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas protéicas que podem exercer um papel importante na patogenia das doenças, tais como: hemolisina, colicina, enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina termoestável (ST), verotoxina ou Shiga-toxina (VT ou Stx) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (BRITO et al., 2001).

Ao menos cinco categorias de cepas de *E. coli* envolvidas na doença intestinal são reconhecidas com base nas diferenças entre os aspectos clínicos e epidemiológicos e nos determinantes específicos de virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC). A

E. coli com aderência difusa (DAEC) tem sido reconhecida como a sexta classe de *E. coli* diarréica (HA; CHOI; CHAE; 2003). Dentre estas categorias a ETEC é uma das causas mais importantes de doenças na indústria suinícola (ZHANG et al., 2007).

Duas importantes enterotoxinas associadas à ETEC foram classificadas como termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). As toxinas LT são classificadas em dois sorogrupos denominados LTI e LTII, baseados em testes de neutralização (PARMA et al., 2000). Os genes codificadores de LTI e LTII estão associados ao DNA plasmidial e cromossomal, respectivamente. A LTI difere da LTII ainda por ser neutralizada pelo soro anti-toxina colérica e pode ser subdividida em LTp produzida por *Escherichia coli* isoladas de suínos e a LTh produzida por *Escherichia coli* isoladas de humanos. As LT2 são também subdivididas em LTIIa e LTIIb, que são antigenicamente distintas (LANG et al., 1994; WRAY; WOODWARD, 1997).

Há dois tipos de toxinas termoestáveis, designadas de STa (também chamada de STI ou ST1) e STb (também chamada de STII ou ST2), que diferem entre si estruturalmente e no mecanismo de ação. STa, STb ou ambas são codificadas por genes plasmidiais e estes variam extensamente no tamanho molecular. Estes também podem codificar LT, fatores fimbriais de colonização, determinantes de resistência a antibióticos e colicinas. Há duas variantes de STa, denominadas STIa (também chamada de STap ou STI suína) e STIb (STah ou STI humana) (PARMA et al., 2000).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) também é chamada de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STE) ou verotoxigênica (VTEC). Esta categoria engloba cepas de *E. coli* produtoras de Shiga-toxinas do tipo 1 (Stx1), do tipo 2 (Stx2) e a Shiga toxina variante 2e relacionada a doença do edema em suínos (Stx2e). Estas toxinas atuam inibindo a síntese protéica e são letais para culturas de células Vero, sendo também conhecidas e descritas na literatura como VT1, VT2 e VT2e (FRANK, 1998; ZMEIFEL et al., 2006). Cepas de *E. coli* produtoras de Stx1 são bem conhecidas como patógenos humanos e causadores de doenças graves como colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica, colite ulcerativa e outras doenças (RILEY et al., 1983).

A Shiga toxina variante 2e (Stx2e) que é descrita principalmente em cepas isoladas a partir de amostras de suínos, causa lesões vasculares no intestino, no tecido subcutâneo e no cérebro, levando a formação de edema e a ocorrência de

sintomas neurológicos (FRYDENDAHL, 2002). Estas cepas geralmente pertencem ao sorogrupo O138, O139, O141 e O147, são frequentemente hemolíticas e produzem a toxina STx2e muitas vezes em conjunto com outras enterotoxinas (NIEWERTH et al., 2001).

Alguns estudos tem relatado o isolamento de cepas de *E. coli* Stx2e positivas em humanos com diarreia e síndrome hemolítico-urêmica e associações entre cepas Stx2e do sorogrupo O101 isoladas de suínos e humanos têm sido avaliadas. O risco de transmissão de cepas de *E. coli* Stx2e a partir de suínos doentes ou saudáveis para os seres humanos não está descartada (ZMEIFEL et al., 2006)

Somado à produção de toxinas, outro fator de virulência expresso pelas EHEC é uma proteína chamada intimina a qual é responsável pela fixação da *E. coli* às células epiteliais intestinais, causando as lesões descritas como “attaching and effacing” na mucosa intestinal. Intimina é codificada pelo gene cromossomal *eae* (UGRINOVICH et al., 2007) Este gene está associado com certos tipos de sorotipos, porém não é sorotipo específico (PARMA et al., 2000).

As cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAggEC) foram reconhecidas por produzirem três toxinas potencialmente capazes de estimular a secreção intestinal. A enterotoxina termoestável denominada EAST-1 foi a primeira a ser reconhecida e também a melhor caracterizada (SEARS; KAPRE, 1996). A EAST-1 tem sido detectada não somente em outras cepas de *E. coli* diarréicas mas também em cepas de ETEC e EPEC de suínos (FRYDENDAHL, 2002). Relatos sugerem que esta enterotoxina pode representar um importante determinante da virulência na patogênese da diarreia dos suínos (NGELEKA et al., 2003).

Outro fator de virulência, a adesina envolvida na aderência difusa (AIDA-I) tem sido recentemente associada com a diarreia suína (ZHANG et al., 2007). Foi demonstrada associação entre a AIDA-I a outros dois fatores de virulência da doença do edema e da diarreia pós-desmame: o fator F18 e a toxina variante Stx2e (NIEWERTH et al., 2001). Entretanto nenhum destes potenciais fatores de virulência (Intimina, EAST-1 e AIDA-I) foram bem caracterizados quanto aos seus significados na diarreia suína e estudos dessas associações com outros fatores de virulência ainda são muito limitados (ZHANG et al., 2007).

2.2 INFECÇÃO EM SUÍNOS

Dentre os principais fatores que predispõem a doença do edema e a diarreia pós-desmame encontram-se o estresse, a queda da imunidade colostrar, troca de ambiente, tensões e brigas entre os leitões. A imaturidade do trato gastrointestinal e a mudança na alimentação, associados à queda da atividade bacteriana gástrica determinada pela diminuição temporária do pH gástrico, bem como a ação parcial da nova dieta, podem causar hipersensibilidade da mucosa intestinal devido ao contato com os antígenos presentes na ração, e atuar como fatores predisponentes para o aparecimento da doença (NABUURS; VANZIJDERVERELDZ, 1993; MACKINNON, 1997; WRAY; WOODWARD, 1997).

No caso da diarreia pós-desmame, geralmente há presença da toxina termolábil (LT) e de fímbrias (F4 ou F18). As cepas ETEC aderindo à mucosa do intestino delgado produzem toxinas que alteram o fluxo de água e eletrólitos causando diarreia pelo excesso de fluido. Quando as cepas são capazes de produzir a toxina Stx2e, esta se distribui na corrente sanguínea e atinge as células endoteliais de diferentes tecidos. O achado mais consistente em estudos envolvendo a inoculação experimental com toxina purificada ou infecção experimental é uma angiopatia degenerativa em pequenas artérias e arteríolas. O fluido encontrado nos diferentes tecidos em animais doentes apresenta baixa concentração protéica e pode ser resultado do aumento da permeabilidade vascular (FAIRBROTHER, 1992; FAUBERT; DROLET, 1992).

As alterações macroscópicas são caracterizadas por edema subcutâneo, sendo mais frequente que em alguns tecidos como no mesocólon, submucosa do estômago e bexiga (FAUBERT; DROLET, 1992). Quanto ao diagnóstico, a detecção da toxina ou de seu gene codificador nas cepas de *E coli* presentes no intestino é importante para a confirmação do envolvimento deste agente, possibilitando assim a prevenção e controle da infecção (WOODWARD; CARROL; WRAY, 1992).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE

Os métodos convencionais para detecção de toxinas são representados por provas biológicas em modelos animais (camundongo, suíno ou coelho), utilizadas para detecção de enterotoxinas termoestáveis (ST) ou enterotoxinas termolábeis (LT), ação das toxinas em cultivo celular para detecção de enterotoxinas termolábeis (LT) e Shiga toxinas (STx), além de testes sorológicos (WOODWARD et al., 1990; MAINIL et al., 1991). No entanto, os métodos convencionais têm sido menos utilizados nos últimos anos por não serem sempre específicos, exigirem o uso de animais além de apresentarem maior tempo para sua execução (WOODWARD; CARROL; WRAY, 1992).

Os métodos de detecção baseados na identificação dos genes codificadores das toxinas e das fímbrias envolvidas nos quadros causados pela *E. coli* são os mais utilizados e representam o principal avanço no diagnóstico molecular de *E. coli* pela sua boa sensibilidade e especificidade (CHENG et al., 2006). As técnicas baseadas em hibridização, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e PCR em tempo real tem sido aplicadas com sucesso na diferenciação de diversos isolados patogênicos (OSEK, 2000; ZMEIFEL et al., 2006).

Nos últimos anos, destaca-se uma preocupação com relação ao aumento de bactérias resistentes aos antimicrobianos (WANG et al., 2011). Em especial, *Escherichia coli*, na qual se relata altas taxas de resistência aos antibióticos na suinocultura (YANG et al., 2004). Este fato indica que a falta de restrição sobre o uso de antimicrobianos na produção de suínos, resultou na disseminação de cepas resistentes a múltiplas drogas, o que ocasiona preocupação pela saúde pública (YANG et al., 2004; TANG et al., 2011). Estudos apontam que resistência às drogas usadas para o tratamento de animais com doença do edema é comum nas cepas Stx2e (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

A resistência deste agente a antimicrobianos é avaliada através de testes de sensibilidade. Nestes casos pode-se empregar a determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) ou a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do teste de microdiluição em caldo ou diluição em agar. Em laboratórios de diagnóstico o teste de disco difusão é o mais usado, devido

principalmente ao baixo custo e maior simplicidade de execução (GALES; REIS; JONES, 2001).

Estudos sobre a diversidade de *E. coli* tiveram início com a caracterização de cepas por sorotipagem e perfil metabólico e diversidade genética através da hibridização de DNA. Abordagens quantitativas surgiram com a aplicação da MLEE (Multi-locus Enzyme Electrophoresis) e continuaram com o armazenamento de dados de sequências nucleotídicas, de únicos genes até a obtenção de sequências de diversos pontos ou MLST (Multi-locus Sequence Typing) e, finalmente, o sequenciamento de todo o genoma (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012).

Baseado nos resultados do MLEE (Multi locus enzyme electrophoresis) Ochman e Selander (1984) estabeleceram uma coleção de 72 cepas de *Escherichia coli* de referência denominada coleção ECOR. Esta coleção inclui cepas de diferentes espécies animais com características de isolados comensais e patogênicos dentre os quais se encontram as cepas EPEC, EHEC, ETEC, EIEC e o gênero *Shigella*. Os estudos filogenéticos realizados caracterizaram esta coleção em quatro grupos principais, identificados como A, B1, B2 e D.

Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), desenvolveram uma reação de PCR para classificação dos isolados de *E. coli* nestes quatro grupos filogenéticos através da presença ou ausência do gene *chuA* (presente nos grupos B2 e D e ausente em B1 e A), gene *yjaA* (presente no grupo B2, ausente do grupo D) e fragmento de DNA TSPE4.C2 (presente no grupo B1, ausente do grupo A). A maior parte dos isolados comensais pertence ao grupo A, enquanto que as *E. coli* extra-intestinais humanas aos grupos B2 e D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), O grupo B2 é o que apresenta maior transferência via elementos genéticos móveis (JOHNSON et al., 2001; SKURNIK et al., 2005), sugerindo uma maior importância na transferência plasmidial de resistência aos antimicrobianos por estes grupos.

As cepas de *E. coli* envolvidas em surtos podem ser caracterizadas também em relação a sua similaridade genética com técnicas que utilizam a separação por eletroforese. A caracterização molecular, como se conhece hoje oferece uma grande variedade de metodologias com especificidade, reprodutibilidade e poder discriminatório variável, muitas das quais tem sido descritas para diferenciar amostras de *E. coli* fenotipicamente semelhantes com sucesso. Uma das técnicas mais empregadas para caracterização molecular de agentes bacterianos como *E. coli* é a PFGE ou eletroforese em campo pulsado (HELGERSON et al., 2006), outra

metodologia menos descrita em cepas de *E. coli*, mas que foi relatada com bom resultados é o SE-AFLP ou polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados com uma única enzima (KNOBL et al., 2012).

O presente estudo propõe em linhas gerais a caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *E. coli* associadas a doença do edema e isoladas em suínos provenientes de diferentes regiões do Brasil.

3 OBJETIVOS

Com base no que foi exposto na revisão de literatura o presente projeto tem como objetivos específicos:

- Estabelecer o perfil de resistência das amostras positivas para Stx2e aos antimicrobianos mais comumente utilizados na cadeia produtiva de suínos.
- Determinar a presença dos fatores de virulência associados à toxina Stx2e em cepas de *E. coli* provenientes de suínos através da PCR.
- Caracterizar as cepas Stx2e quanto a classificação filogenética segundo Clermont et al. (2000).
- Avaliar a expressão da toxina Stx2e em cultivos celulares da linhagem Vero.
- Avaliar a similaridade entre os isolados através da eletroforese em campo pulsado.
- Avaliar a similaridade dos isolados através do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados com uma única enzima
- Determinar uma possível associação entre a origem dos isolados, os sorotipos, os fatores de virulência das cepas de *E. coli*, o perfil de resistência aos antimicrobianos e o perfil genotípico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram testados 1500 animais provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Goiás e Minas Gerais e para o presente estudo foram incluídas apenas as cepas positivas para a presença do gene *stx2_e*. As cepas selecionadas são provenientes de granjas com suspeita de doença do edema e diarreia pós desmame examinadas entre setembro de 2010 e março de 2012.

4.2 ISOLAMENTO E REPIQUE DAS CEPAS

As amostras de fezes coletadas no período descrito anteriormente foram semeadas em Agar MacConkey e incubadas a 37° C por 24 horas. De cada suíno avaliado, 10 colônias lactose positivas foram selecionadas e semeadas em caldo BHI sob a forma de um pool para pesquisa do gene codificador da toxina Stx2e.

A partir da placa de ágar MacConkey dos animais que apresentaram resultado positivo no PCR do pool de colônias (Stx2e+) foram selecionadas novamente cinco colônias que foram submetidas à identificação bioquímica através do painel para identificação de enterobactérias da Probac do Brasil e submetidas individualmente a PCR para pesquisa do gene codificador da toxina.

4.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme padrões definidos no documento M31-A3 do NCCLS (2008).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de disco-difusão foi preparado à partir dos cultivos puros de *E. coli* Stx2e+ semeado em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37 °C. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente 1 a 2 X 10⁸ UFC/mL.

Um suabe estéril e não-tóxico foi introduzido no interior do tubo contendo a suspensão bacteriana ajustada, pressionado contra a parede do tubo a fim de remover o excesso da suspensão embebida na extremidade do suabe e então, estriado por toda a superfície do ágar Mueller Hinton.

Após a semeadura do inóculo sobre a superfície do ágar, os discos impregnados com princípios antimicrobianos foram distribuídos individualmente.

Foram testados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefotaxina, cefoxitina, ceftiofur, sulfonamidas, cotrimoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacin, espectinomicina, florfenicol, estreptomicina e gentamicina.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA PCR

A extração do DNA bacteriano empregado na PCR foi realizada através do método descrito por Boom et al. (1990). As cepas foram caracterizadas e selecionadas com base na presença do gene codificador da toxina Stx2e. Na sequência foram pesquisados os outros genes de virulência propostos, representados no quadro 1.

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado à um microtubo 40 pmoles de cada primer (ZHANG et al., 2007), 2 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), 5µL do tampão da enzima [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. Para amplificação dos genes pesquisados o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72° por 5 minutos. A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo para o gene do fator mencionado e um controle negativo.

Quadro 1 - Distribuição dos genes nas diferentes reações e tamanho dos fragmentos amplificados

Reação 1	Primer	Tamanho (pb)
STb	GCTACAAATGCCTATGCATCTACACA CATGCTCCAGCAGTACCATCTCTAAC	150
LT	ACGGCGTTACTATCCTGTCTATGTGC TTGGTCTCGGTCAGATATGTGATTCT	290
K88	TGAATGACCTGACCAATGGTGGAAACC GCGTTTACTCTTTGAATCTGTCCGAG	500
Reação 2		Tamanho (pb)
F18	TGGCACTGTAGGAGATACCATTTCAGC GGTTTGACCTTTCAGTTGAGCAG	380
STa	GTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCT CATGGAGCACAGGCAGGATTACAACA	190
Reação 3		Tamanho (pb)
K99	GCGACTACCAATGCTTCTGCGAATAC GAACCAGACCAGTCAATACGAGCA	250
987P	GCCAGTCTATGCCAAGTGGATACTTC GTTTGTATCAGGATTCCCTGTGGTGG	400
F41	TTAGCAGCGAAGATGAGTGATGGG GTACTACCTGCAGAAACACCAGATCC	600
Reação 4		Tamanho (pb)
EAST1	ATG CCA TCA ACA CAG TAT ATC TCA GGT CGC GAG TGA CGG	125
Paa	CCA TAA AGA CAG CTT CAG TGA AAA GTA TTA CTG GTA CCA CCA CCA TCA	360
AIDA-I	ACA GTA TCA TAT GGA GCC A TGT GCG CCA GAA CTA TTA	585
EAE	CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA	790

Os produtos de PCR (10 μ L) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com 0,7 μ L de BlueGreen. [®] (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação ImageMaster[®] (Amershan Biosciences) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

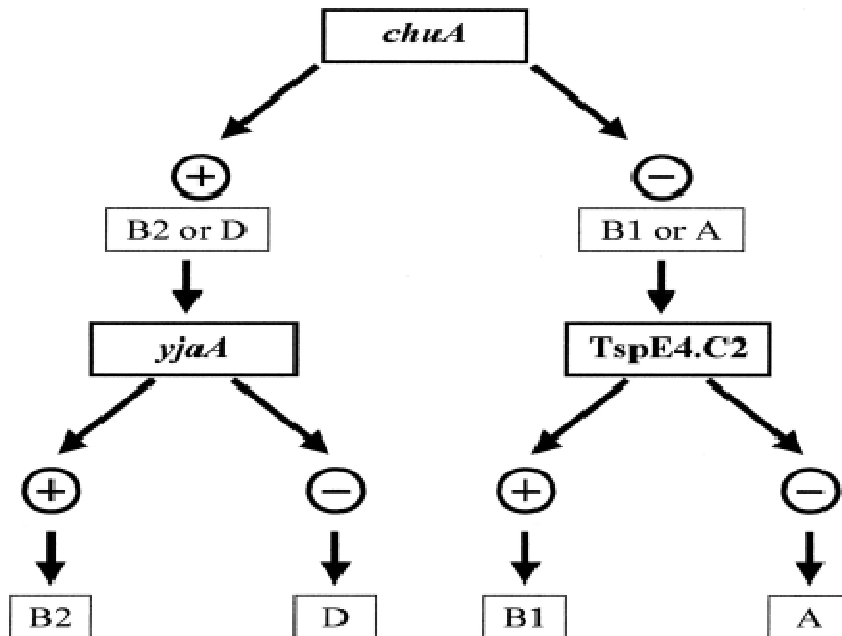
4.5 CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *E. COLI* SEGUNDO OS GRUPOS FILOGENÉTICOS

O grupo filogenético dos isolados de *E. coli* foi determinado baseando-se na amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* segundo o esquema propostos por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) (Figura 1, Quadro 2).

Quadro 2- Sequência dos oligonucleotídeos que foram empregados na classificação dos isolados de *E. coli* segundo os grupos filogenéticos

Genes	Primers	Sequência	Produto
<i>chuA</i>	P763	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
	P764	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	P765	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
	P766	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>tspE4.C2</i>	P767	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152
	P768	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Figura 1 - Esquema utilizado para a determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* baseado na amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*



Fonte: Clermont et al. (2000)

4.6 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

As amostras foram submetidas ao perfil de macro-restrição com a enzima *XbaI* através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad).

Os blocos contendo as amostras bacterianas foram colocados em gel de agarose 1% (FMC BioProducts), e a corrida foi conduzida num período de 24h a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, a 14° C, com um bloco de pulso inicial de 7s e final de 12s por 11h, e outro bloco com pulso inicial de 20s e final de 40 s por 13h.

O gel foi corado por 40min em uma solução de Syber Safe® (Invitrogen) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de fotodocumentação Gel doc XR (Bio Rad). Os fragmentos foram identificados com

base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFGE (New England Biolabs).

4.7 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOOS AMPLIFICADOS (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por Mclauchiln et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III. Para clivagem do DNA bacteriano, 4 μ g de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 μ L. O tubo foi incubado a 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5 μ L do DNA clivado foi adicionada a um microtubo contendo 0,2 μ g dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 μ L. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80 °C por 10 minutos.

Para realização da PCR foram testados “primers” seletivos com variações no nucleotídeo terminal, sendo testadas as seqüências HI-A, HI-T, HI-G e HI-C A seqüência de bases dos “primers” a ser utilizada para ligação e amplificação e sua posição relativa ao sítio de restrição da enzima *Hind*III.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 μ l do DNA ligado diluído, 2,5 mM de $MgCl_2$, 300 ng do “primer” (HI-X), 1U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 μ L. A reação foi submetida à desnaturação a 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60° C e 2,5 minutos a 72°C.

A detecção dos produtos de amplificação (20 μ l produto e 5 μ l de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação Gel doc XR (Bio Rad), sendo os mesmos corados com

BlueGreen. ® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

4.8 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO DA TOXINA Stx2e EM LINHAGENS DE CÉLULA VERO

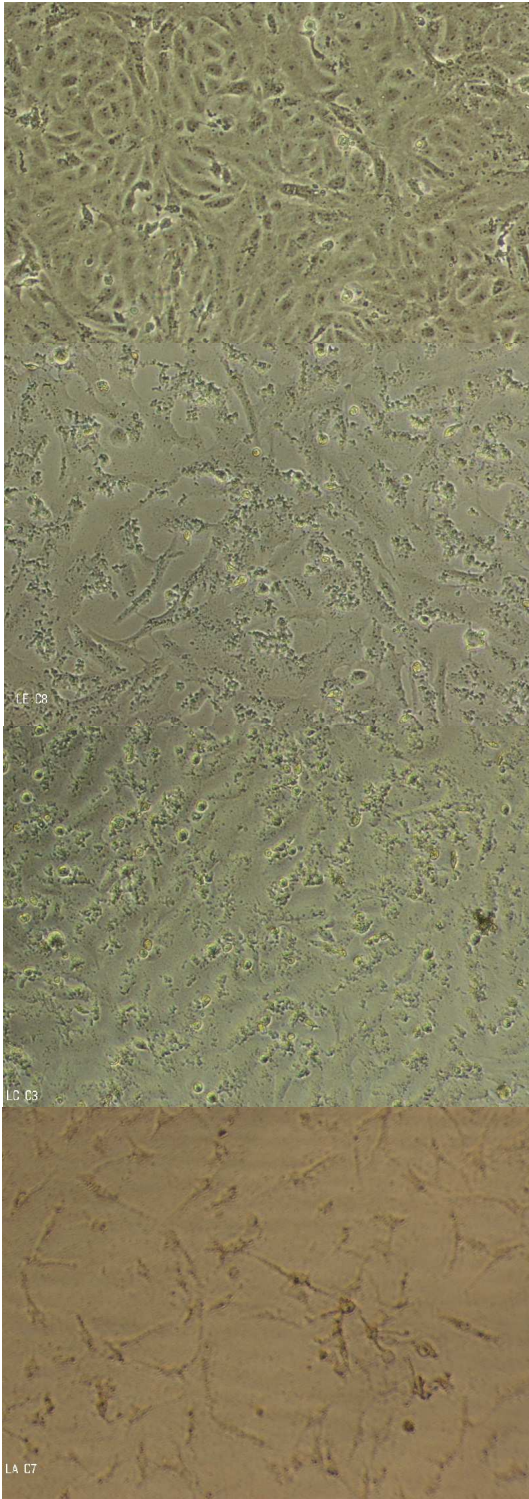
A detecção da produção da toxina Stx2e foi realizada como previamente descrita (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977). As cepas foram semeadas em meio mínimo sob agitação por 24 h a 37° C. Após este período uma alíquota de 1 mL foi adicionada a um microtubo de 1,5 ml e recebeu 100 µL de colistina (1 mg/mL) e mantida em temperatura ambiente por 30 min. Após este período a amostra foi centrifugada a 10 000 rpm/30 min a 4° C e o sobrenadante foi filtrado em membrana descartável de 0,45 µm.

As células das linhagens Vero foram cultivadas em Meio Mínimo Eagle (MEM) com soro bovino a 10% e gentamicina 0,1%. Foram tripsinizadas e volumes de 500 µL foram distribuídos em microplacas de 48 poços à concentração de 2.0×10^4 células/ ml. As microplacas foram incubadas em 5% CO₂ a 37°/ 24h. Após a formação das monocamadas foi adicionado 50 µl do sobrenadante filtrado das culturas de *E. coli*. As células foram observadas para visualização do efeito citotóxico 24 e 48h após a inoculação e os resultados fotografados.

Para cada placa foi mantido dois poços com células não inoculadas, dois poços com células inoculadas com o mesmo meio de cultura e antimicrobiano utilizado no preparo da *E. coli*.

As lesões observadas nos cultivos de células Vero foram classificadas em negativa, grau 1 (+), grau 2 (++) e grau três (+++) conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Lesões representativas em células Vero em diferentes graus



Célula Vero – controle negativo 48 h

Célula Vero – Cultivo inoculado com
toxina Stx2e 48 h- Lesão grau 1 (+)

Célula Vero – Cultivo inoculado com
toxina Stx2e 48 h- Lesão grau 2 (++)

Célula Vero – Cultivo inoculado com
toxina Stx2e 48 h- Lesão grau 3 (+++)

4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para análise estatística dos fragmentos amplificados foi utilizado o programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA), que foi representado pela forma de dendrograma.

O índice discriminatório foi calculado como descrito por Hunter e Gaston (1988). Para análise dos resultados da PFGE foram considerados pulsotipos e para ao SE-AFLP forma considerados em diferentes perfis cepas que apresentaram similaridade inferior a 90%. (VAN BELKUM et al., 2007).

5 RESULTADOS

A partir do isolamento do agente em 1500 animais foram selecionadas 158 cepas de *E. coli* positivas para a presença do gene *stx2_e*, estas cepas foram provenientes de 62 animais, originados de 13 sistemas de produção, dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraná e Minas Gerais.

As 158 cepas *stx2_e* + foram submetidas realização do antibiograma através da prova de disco-difusão e o resultado é apresentado a seguir na tabela 1 e nos gráficos de 1 a 5.

Tabela 1 – Resultado antibiograma das 158 amostras de *E. coli*

Antimicrobianos	Sensível N (%)	Intermediário N (%)	Resistente N (%)
Amox/Ác. Clav	148 (93,67)	8 (5,06)	2 (1,26)
Ampicilina	56 (35,44)	14 (8,86)	88 (55,70)
Cefotaxima	144 (91,14)	13 (8,23)	1 (0,63)
Cefoxitina	151 (95,57)	6 (3,79)	1 (0,63)
Ceftiofur	135 (85,44)	21 (13,29)	2 (1,27)
Sulfonamidas	10 (6,33)	12 (7,6)	136 (86,08)
Cotrimoxazol	59 (37,34)	6 (3,8)	93 (58,86)
Tetraciclina	20 (12,66)	0	138 (87,34)
Ác. Nalidíxico	64 (40,51)	32 (20,25)	62 (39,24)
Norfloxacina	135 (85,44)	16 (10,13)	7 (4,43)
Enrofloxacina	78 (49,37)	58 (36,71)	22 (13,92)
Espectinomicina	125 (79,11)	13 (8,23)	20 (12,66)
Florfenicol	43 (27,22)	16 (10,13)	99 (62,66)
Estreptomina	29 (18,35)	49 (31,01)	80 (50,63)
Gentamicina	129 (81,65)	15 (9,5)	14 (8,87)

Gráfico 1 - Frequência de cepas resistentes, com sensibilidade intermediária e sensíveis aos antimicrobianos beta lactâmicos testados (%)

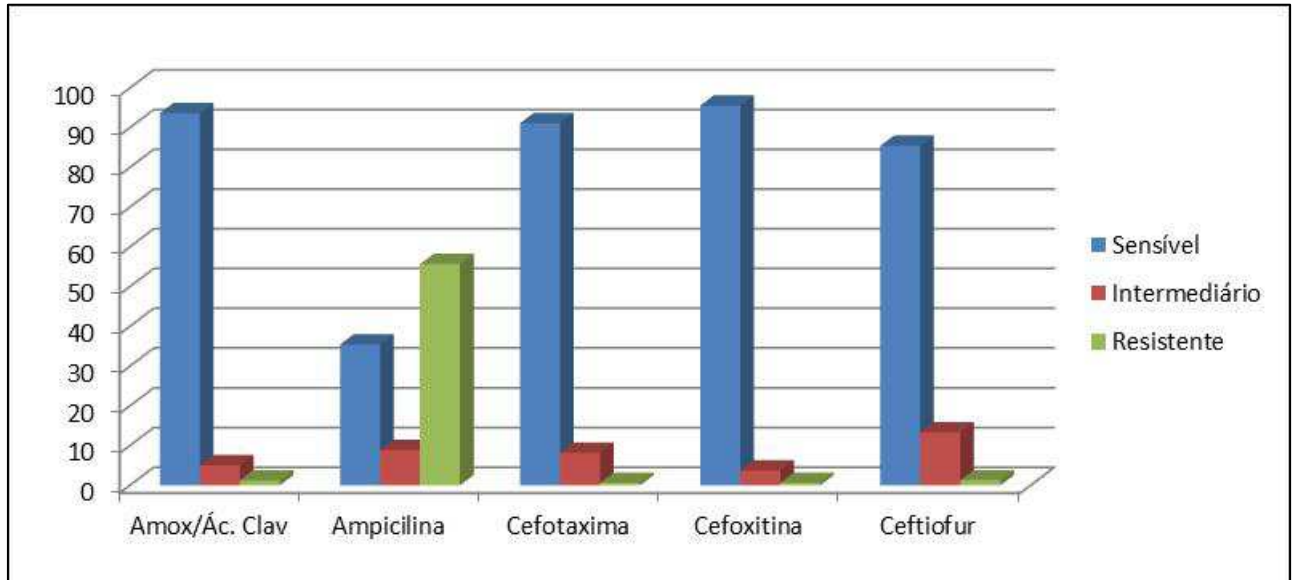


Gráfico 2 - Frequência de cepas resistentes, com sensibilidade intermediária e sensíveis sulfonamidas e a combinação sulfa-trimetoprima (%)

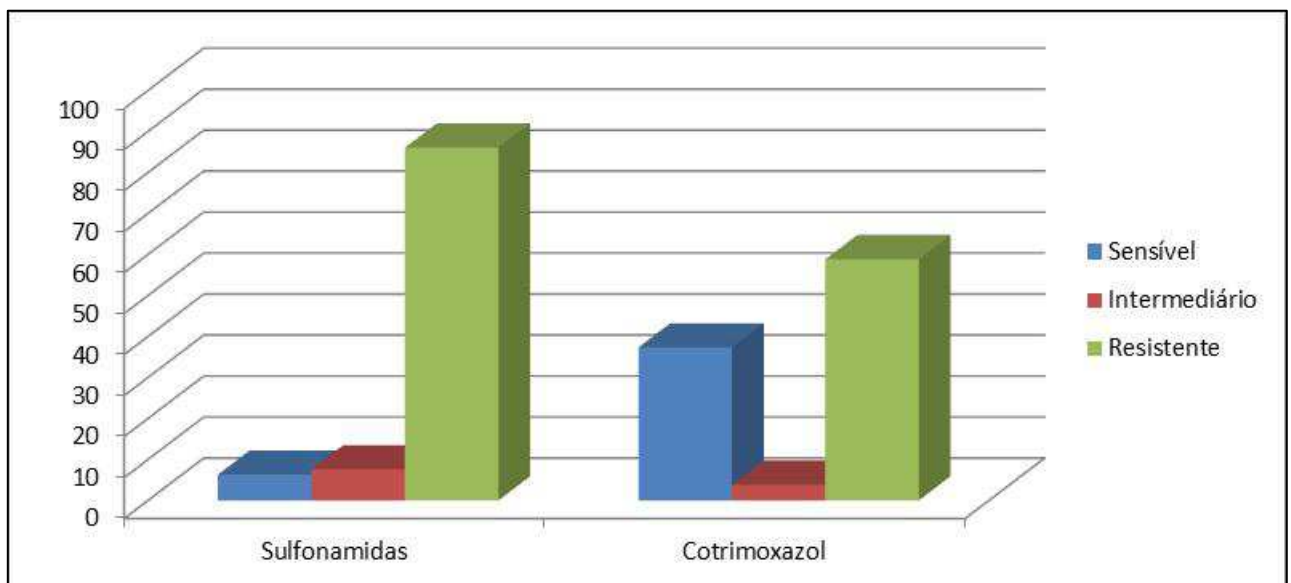


Gráfico 3 - Frequência de cepas resistentes, com sensibilidade intermediária e sensíveis quinolonas testadas (%)

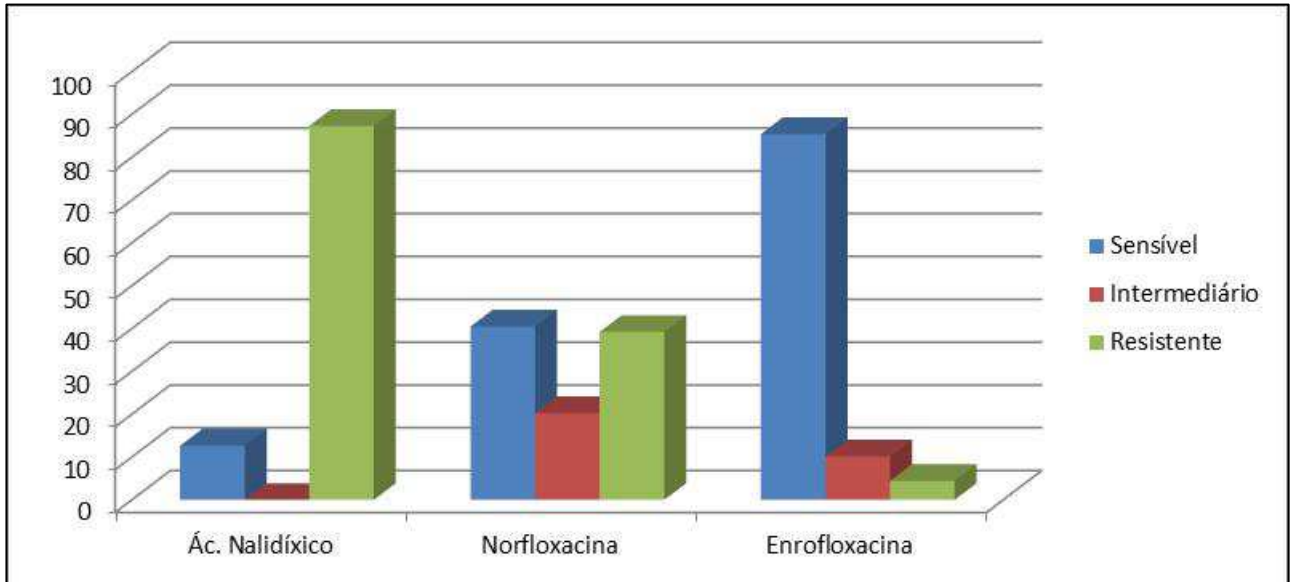


Gráfico 4 - Frequência de cepas resistentes, com sensibilidade intermediária e sensíveis aos aminoglicosídeos testados (%)

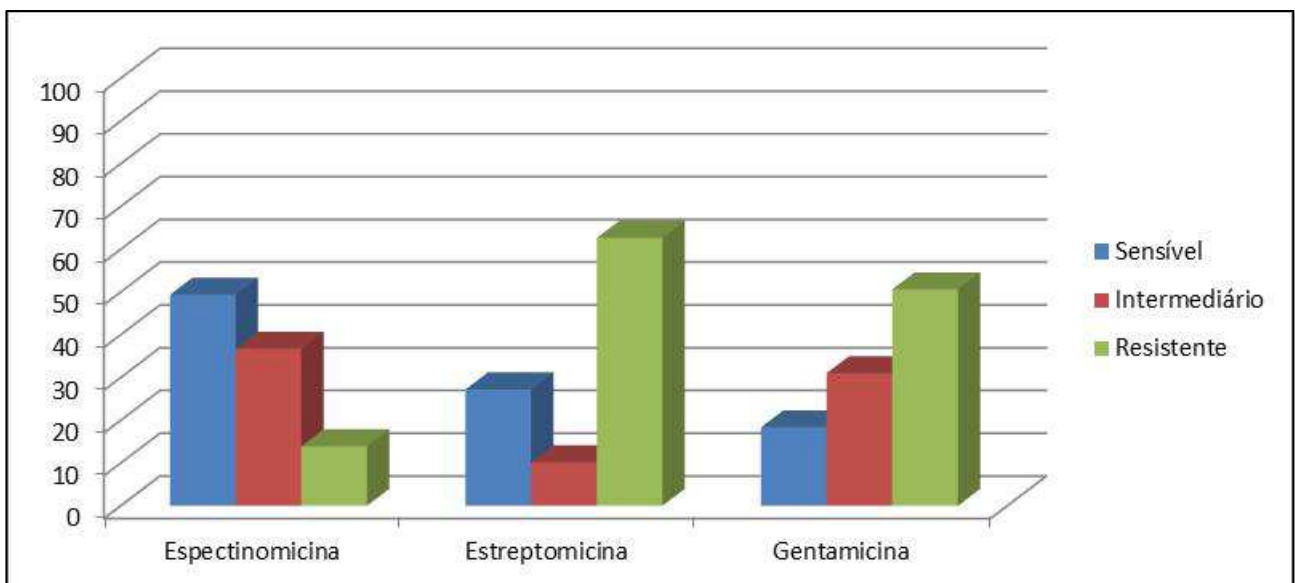
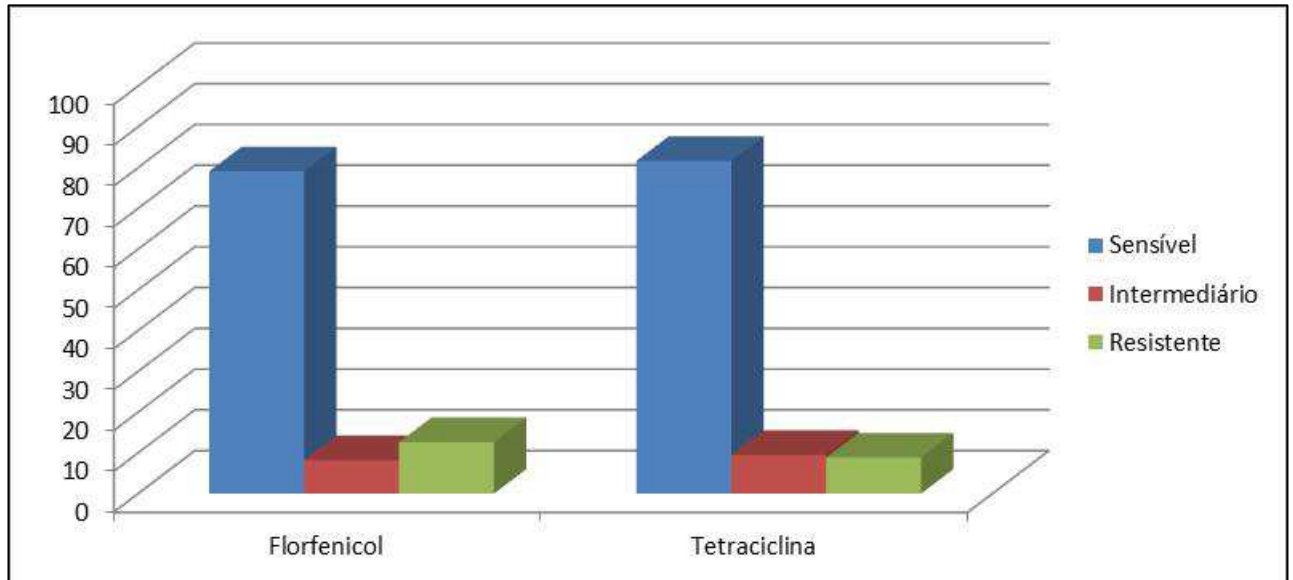


Gráfico 5 - Frequência de cepas resistentes, intermediárias e sensíveis aos antimicrobianos inibidores de síntese proteica florfenicol e tetraciclina (%)



Nos gráficos 3 e 5 e da tabela 2 é possível verificar que a grande maioria dos isolados apresentou multirresistência a antimicrobianos, caracterizada por resistência a pelo menos uma droga testada em pelo menos três classes diferentes dentre os antimicrobianos testados.

Tabela 2 - Caracterização das cepas de *E. coli* stx2e+ quanto ao número de classes de antimicrobianos a que são resistentes

Padrão de resistência	Número	%
Sensível a todas as classes de antimicrobianos	2	1,3
Sensível a 1 classe de antimicrobiano	8	5,0
Sensível a 2 classes de antimicrobianos	16	10,1
Sensível a 3 classes de antimicrobianos	24	15,2
Sensível a 4 classes de antimicrobianos	42	26,6
Sensível a 5 classes de antimicrobianos	52	32,9
Sensível a 6 classes de antimicrobianos	14	8,9

As cepas positivas para o gene *stx2_e* foram testadas quanto a presença dos genes de virulência codificadores de enterotoxinas (LT, STa, STb, EAST-1), fímbrias e adesinas (K88, F18, 987P, F41, AIDA-1), proteína associada a lesão “attaching and effacing (A/E)” em suínos e intimina. Dentre as 158 cepas testadas foram observadas diferentes ocorrências dos genes que são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência em 158 cepas de *E. coli* positivas para *stx2_e*

Genes pesquisados	Número (%)
STa	6 (3,9)
STb	9 (5,7)
F18	4 (2,5)
STb/STa	3 (1,9)
STb/LT	5 (3,0)
STb/LT/K88	4 (2,5)
STb/STa/F18	2 (1,3)
STb/LT/K88/STa	1 (0,6)
STb/LT/STa/F18	1 (0,6)
Negativo	123 (78)

As cepas foram avaliadas quanto a capacidade de produzir a toxina Stx2e em cultivos de célula Vero, sendo que todas as 158 causaram efeito citotóxico em 24 ou 48h. O efeito observado foi classificado em três graus de severidade (+, ++ ou +++), resultados na tabela 4.

A caracterização das cepas através da pesquisa dos genes propostos por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) resultou na distribuição das cepas *stx2_e* + em quatro grupos com as seguintes frequências: Grupo A – 27,2% (43/158), grupo B1- 3,8% (6/158), grupo B2- 39,2% (62/158), grupo D- 29,8% (47/158).

Tabela 4- Ocorrência dos diferentes graus de lesão observados em cultivo de célula Vero após 24 ou 48 horas de incubação.

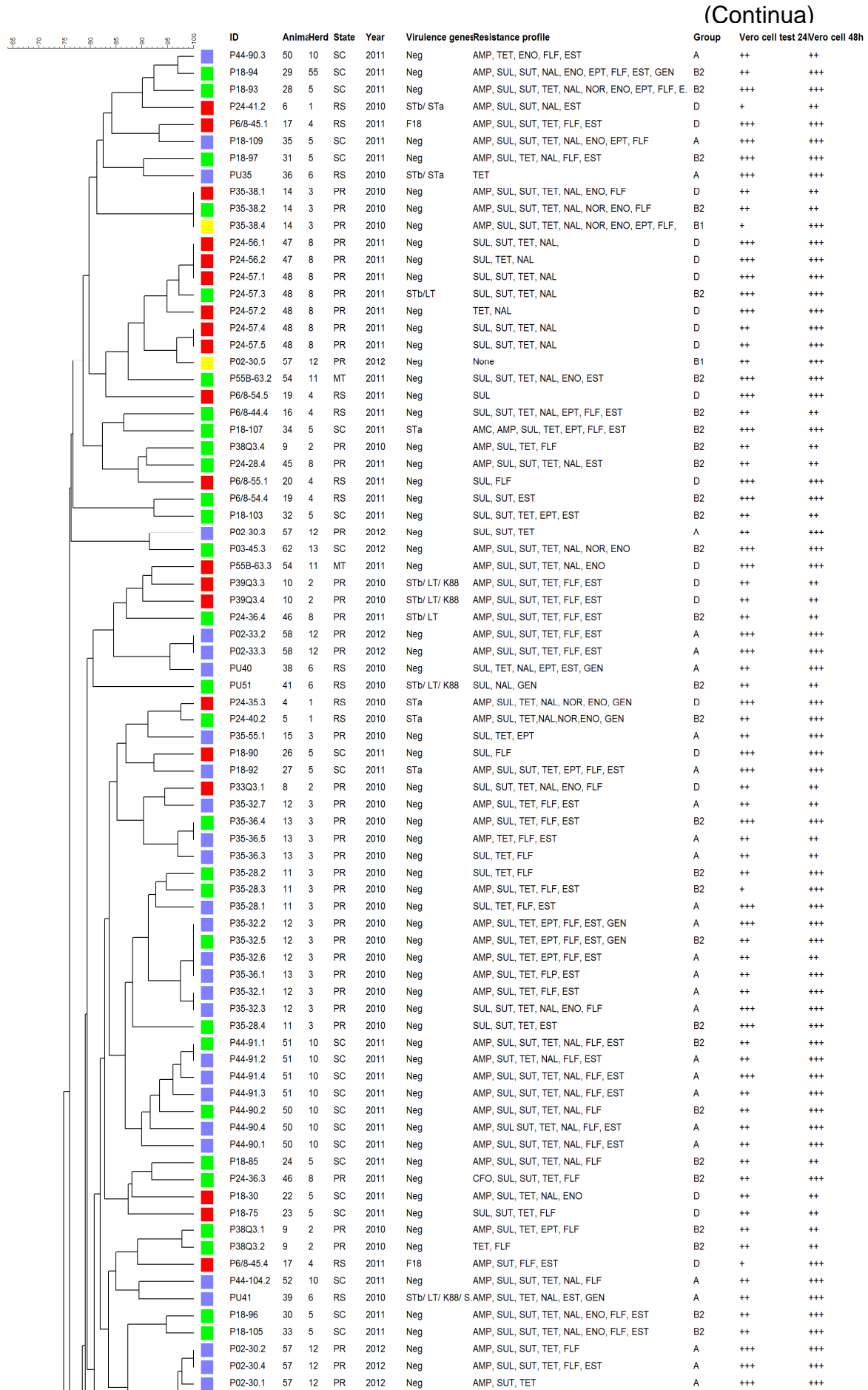
Perfil	Célula Vero		N (%)
	24h	48h	
1	+	++	5 (3,3)
2	+	+++	3 (1,9)
3	++	++	44 (27,8)
4	++	+++	50 (31,6)
5	+++	+++	56 (35,4)

A caracterização dos isolados através da PFGE gerou 76 pulsotipos formados por 1 a 11 cepas com similaridade igual ou maior a 90%. As cepas apresentaram de 12 a 24 bandas com tamanho variando entre 30 Kb e 600 Kb. O índice discriminatório na análise pela PFGE foi igual a 0,98.

As bandas formadas através do PFGE foram próximas e de intensidade variável dificultando um pouco a análise, mesmo com a utilização do programa Bionumerics 6.6, o que pode ser verificado na figura 4.

Os resultados obtidos através da PFGE são ilustrados pelas figuras 3 e 4. Como pode ser observado nos dendrogramas não houve correlação entre os agrupamentos formados e a classificação proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Na maioria dos casos ocorreu a reunião de cepas do mesmo animal e de mesma granja com 90 a 100% de similaridade. A correlação dos perfis de resistência e dos agrupamentos pode ser observada em vários casos apresentados nas figuras.

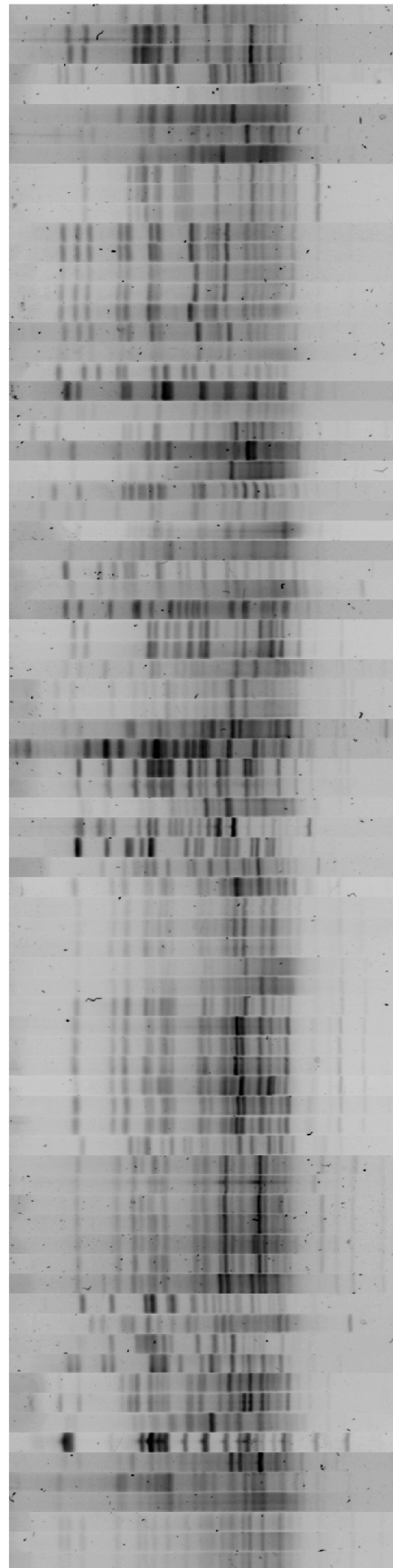
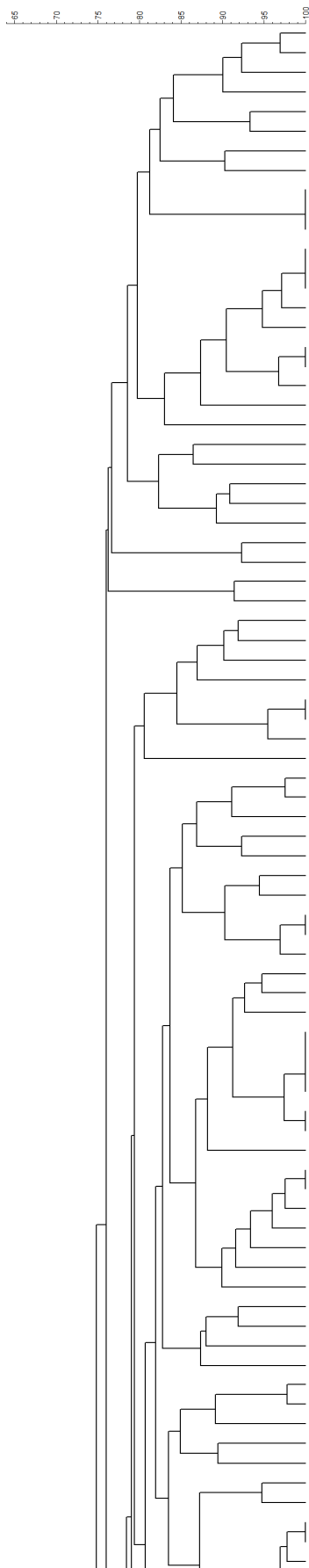
Figura 3 - Dendrograma criado para análise dos resultados da PFGE baseado no coeficiente de Dice e UPGMA. Cepas de *E. coli* Stx_{2e} positivas. Caixas coloridas evidenciam os grupos em que as cepas foram classificadas (grupos A-roxo, B1-amarelo, B2-verde e D-vermelho)



(Conclusão)

■	P02-29.1	56	12	PR	2012	Neg	SUL, SUT, TET	B2	++	+++
■	P02-29.2	56	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET	A	+++	+++
■	P02-29.3	56	12	PR	2012	Neg	SUL, SUT, TET, EPT, FLF	B2	+++	+++
■	P02-28.1	55	12	PR	2012	Neg	SUL, SUT, TET	B2	++	+++
■	P02-28.3	55	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EPT, FLF	B2	++	+++
■	P02-28.4	55	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, EPT, FLF, EST	B2	++	+++
■	P02-28.5	55	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF	B2	++	++
■	P02-28.2	55	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF	B2	++	+++
■	P38Q3.3	9	2	PR	2010	Neg	None	B2	+	++
■	P6/8-44.1	16	4	RS	2011	F18	AMP, SUL, SUT, FLF, EST	D	++	++
■	P6/8-47.1	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST	D	++	+++
■	P6/8-47.3	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST	D	++	++
■	P6/8-47.2	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST	D	++	++
■	P6/8-47.4	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUT, TET, FLF, EST	D	+	++
■	P6/8-47.5	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST	D	+++	+++
■	P55B-63.4	54	11	MT	2011	Neg	NAL, NOR, ENO	D	+++	+++
■	P35-38.3	14	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, FLF, EST, GEN	A	++	++
■	P55B-63.1	54	11	MT	2011	Neg	AMP, SUL, TET, FLF	D	+++	+++
■	P03-45.2	62	13	SC	2012	Neg	SUL, TET, NAL	B2	+++	+++
■	P24-17.2	2	1	RS	2010	Neg	TET	A	++	++
■	P24-32.4	3	1	RS	2010	STa	SUL, TET, EPT	B2	++	++
■	P24-17.1	2	1	RS	2010	STa	TET	A	++	+++
■	P24-15.4	1	1	RS	2010	Neg	SUL, TET,	B2	++	+++
■	PU48	40	6	RS	2010	STb/ LT	SUL, SUT, TET, NAL, EST	A	++	++
■	P24-25.2	44	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST	B2	+++	+++
■	P24-28.1	45	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST	B2	++	+++
■	P44-91.5	51	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLF, EST	A	+++	+++
■	P35-55.8	15	3	PR	2010	Neg	SUL, SUT, TET	B1	+++	+++
■	PU60	42	6	RS	2010	STb/ LT/ K88	SUL, SUT, TET,	B2	+++	+++
■	P02-45.1	60	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF	B2	++	+++
■	P02-45.2	60	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF	B2	+++	+++
■	P02-45.4	60	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF	B2	++	++
■	P02-45.5	60	12	PR	2012	STb	TET, FLF	B2	++	+++
■	P24-32.2	3	1	RS	2010	STa	SUL, NAL, EST	D	++	++
■	P18-87	25	5	SC	2011	Neg	AMP, SUT, TET, FLF	B2	++	++
■	P03-45.5	62	13	SC	2012	STb	AMP, SUL, TET, NAL, ENO, EPT	B2	++	+++
■	P6/8-96.2	21	4	RS	2011	Neg	SUL, SUT, TET, NAL, FLF, EST	D	++	+++
■	P24-36.1	46	8	PR	2011	Neg	TET, NAL, FLF, EST	B2	++	+++
■	P55B-63.5	54	11	MT	2011	Neg	SUL, SUT, TET, NAL, ENO	A	+++	+++
■	P35-28.8	11	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, EPT, FLF, EST	A	++	++
■	P6/8-45.5	17	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, FLF, EST	D	++	+++
■	P6/8-55.5	20	4	RS	2011	STb/ STa	SUL, TET	A	++	++
■	P6/8-55.4	20	4	RS	2011	STb/ STa	SUL, TET	D	+++	+++
■	P24-42.1	7	1	RS	2010	Neg	SUL, TET, FLF	D	+	++
■	P24-42.4	7	1	RS	2010	Neg	TET, FLF, EST	B2	++	++
■	P44-166.1	53	10	SC	2011	Neg	AMP, CTF, SUL, SUT, TET, NAL, EST	B1	++	+++
■	P44-166.2	53	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, EST	B1	+++	+++
■	P44-166.3	53	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, TET, NAL, EST	D	++	+++
■	P44-166.4	53	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, EST	D	++	+++
■	PU39	37	6	RS	2010	STb/ LT/ K88	SUT, TET, NAL	A	++	++
■	P02-34.5	59	12	PR	2012	STb/ STa/ F18	SUL, SUT, NAL	B2	+++	+++
■	P24-36.2	46	8	PR	2011	Neg	SUL, SUT, FLF	D	+	++
■	P24-25.4	44	8	PR	2011	STb	AMP, SUL, SUT, TET, EPT, FLF	B2	++	++
■	P24-25.5	44	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, TET, FLF	B2	++	++
■	P24-25.3	44	8	PR	2011	STb	SUL, SUT, TET, EPT, FLF	B2	+++	+++
■	P35-55.7	15	3	PR	2010	Neg	SUL, SUT, TET, NAL, ENO, FLF	B2	++	++
■	P6/8-54.1	19	4	RS	2011	Neg	SUL, TET	D	++	+++
■	P35-28.5	11	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, EPT, EST	B2	+++	+++
■	P35-28.6	11	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, EPT, FLF, EST	B1	++	+++
■	P03-44.1	61	13	SC	2012	STb	SUL	A	++	++
■	P03-44.2	61	13	SC	2012	STb	CTX, TET	A	+++	+++
■	P03-44.3	61	13	SC	2012	STb	TET	A	++	+++
■	P03-44.4	61	13	SC	2012	STb	TET	A	++	+++
■	P03-45.4	62	13	SC	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, ENO	B2	+++	+++
■	P02-29.4	56	12	PR	2012	Neg	AMP, CTF, SUL, TET, FLF	D	++	+++
■	P6/8-44.5	16	4	RS	2011	F18	AMP, SUL, SUT, FLF, EST, GEN	B2	++	++
■	P6/8-45.2	17	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF, EST, GEN	D	+++	+++
■	P24-17.4	2	1	RS	2010	Neg	SUL, TET, EPT	A	++	++
■	P6/8-96.3	21	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, EST	D	++	++
■	P6/8-44.2	16	4	RS	2011	STb	SUL, TET, FLF, EST	B2	++	++
■	P02-34.1	59	12	PR	2012	STb/ STa/ F18	SUL, TET, NAL, FLF, EST	D	+++	+++
■	P164/25	43	7	MG	2010	STb/ LT/ STa/	SUL, SUT, TET, NAL, EST	B2	++	+++
■	P02-34.3	59	12	PR	2012	Neg	SUL, TET, NAL, FLF, EST	D	+++	+++
■	P02-34.4	59	12	PR	2012	Neg	SUL, TET, NAL, FLF, EST	D	++	+++
■	P82/1.1	49	9	MT	2011	STb/ STa/ F18	SUL, TET, FLF, EST	D	+++	+++
■	P82/1.2	49	9	MT	2011	STb/ STa/ F18	SUL, TET, FLF, EST, GEN	D	+++	+++
■	P82/1.3	49	9	MT	2011	STb/ STa/ F18	SUL, TET, FLF, EST, GEN	D	+++	+++
■	P02-29.5	56	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLF	B2	++	+++
■	P6/8-45.3	17	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, FLF, EST	D	++	+++

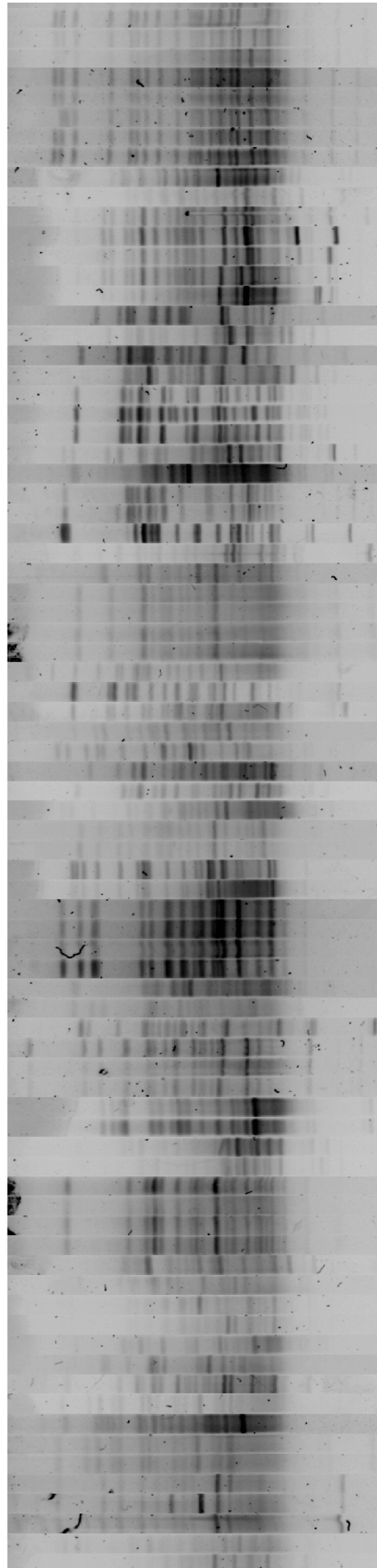
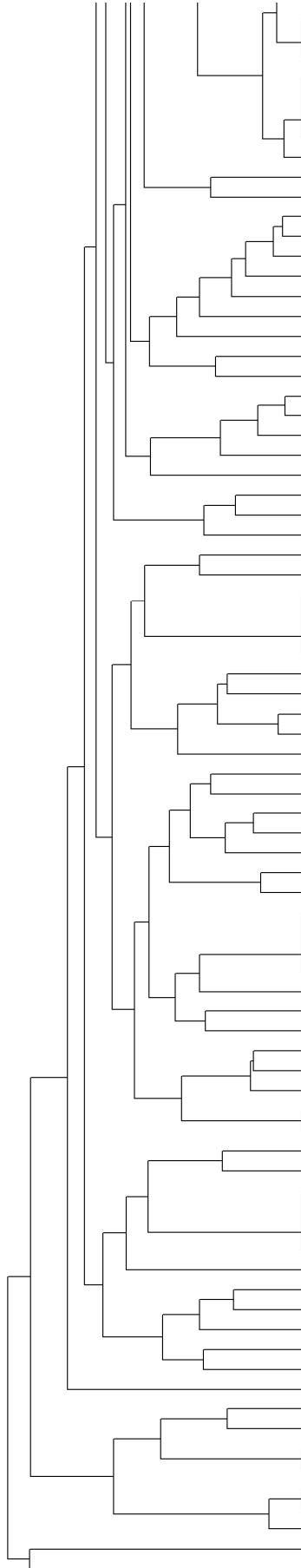
Figura 4 - Dendrograma criado para análise dos resultados da PFGE baseado no coeficiente de Dice e UPGMA. Cepas de *E. coli* Stx2_e positivas . Detalhe dos padrões de bandas observados no gel de agarose



(Continua)

ID	Animal	Herd	State	Year
P44-90.3	50	10	SC	2011
P18-94	29	55	SC	2011
P18-93	28	5	SC	2011
P24-41.2	6	1	RS	2010
P6/8-45.1	17	4	RS	2011
P18-109	35	5	SC	2011
P18-97	31	5	SC	2011
PU35	36	6	RS	2010
P35-38.1	14	3	PR	2010
P35-38.2	14	3	PR	2010
P35-38.4	14	3	PR	2010
P24-56.1	47	8	PR	2011
P24-56.2	47	8	PR	2011
P24-57.1	48	8	PR	2011
P24-57.3	48	8	PR	2011
P24-57.2	48	8	PR	2011
P24-57.4	48	8	PR	2011
P24-57.5	48	8	PR	2011
P02-30.5	57	12	PR	2012
P55B-63.2	54	11	MT	2011
P6/8-54.5	19	4	RS	2011
P6/8-44.4	16	4	RS	2011
P18-107	34	5	SC	2011
P38Q3.4	9	2	PR	2010
P24-28.4	45	8	PR	2011
P6/8-55.1	20	4	RS	2011
P6/8-54.4	19	4	RS	2011
P18-103	32	5	SC	2011
P02-30.3	57	12	PR	2012
P03-45.3	62	13	SC	2012
P55B-63.3	54	11	MT	2011
P39Q3.3	10	2	PR	2010
P39Q3.4	10	2	PR	2010
P24-36.4	46	8	PR	2011
P02-33.2	58	12	PR	2012
P02-33.3	58	12	PR	2012
PU40	38	6	RS	2010
PU51	41	6	RS	2010
P24-35.3	4	1	RS	2010
P24-40.2	5	1	RS	2010
P35-55.1	15	3	PR	2010
P18-90	26	5	SC	2011
P18-92	27	5	SC	2011
P33Q3.1	8	2	PR	2010
P35-32.7	12	3	PR	2010
P35-36.4	13	3	PR	2010
P35-36.5	13	3	PR	2010
P35-36.3	13	3	PR	2010
P35-28.2	11	3	PR	2010
P35-28.3	11	3	PR	2010
P35-28.1	11	3	PR	2010
P35-32.2	12	3	PR	2010
P35-32.5	12	3	PR	2010
P35-32.6	12	3	PR	2010
P35-36.1	13	3	PR	2010
P35-32.1	12	3	PR	2010
P35-32.3	12	3	PR	2010
P35-28.4	11	3	PR	2010
P44-91.1	51	10	SC	2011
P44-91.2	51	10	SC	2011
P44-91.4	51	10	SC	2011
P44-91.3	51	10	SC	2011
P44-90.2	50	10	SC	2011
P44-90.4	50	10	SC	2011
P44-90.1	50	10	SC	2011
P18-85	24	5	SC	2011
P24-36.3	46	8	PR	2011
P18-30	22	5	SC	2011
P18-75	23	5	SC	2011
P38Q3.1	9	2	PR	2010
P38Q3.2	9	2	PR	2010
P6/8-45.4	17	4	RS	2011
P44-104.2	52	10	SC	2011
PU41	39	6	RS	2010
P18-96	30	5	SC	2011
P18-105	33	5	SC	2011
P02-30.2	57	12	PR	2012
P02-30.4	57	12	PR	2012
P02-30.1	57	12	PR	2012

(Conclusão)



P02-29.1	56	12	PR	2012
P02-29.2	56	12	PR	2012
P02-29.3	56	12	PR	2012
P02-28.1	55	12	PR	2012
P02-28.3	55	12	PR	2012
P02-28.4	55	12	PR	2012
P02-28.5	55	12	PR	2012
P02-28.2	55	12	PR	2012
P38Q3.3	9	2	PR	2010
P6/8-44.1	16	4	RS	2011
P6/8-47.1	18	4	RS	2011
P6/8-47.3	18	4	RS	2011
P6/8-47.2	18	4	RS	2011
P6/8-47.4	18	4	RS	2011
P6/8-47.5	18	4	RS	2011
P55B-63.4	54	11	MT	2011
P35-38.3	14	3	PR	2010
P55B-63.1	54	11	MT	2011
P03-45.2	62	13	SC	2012
P24-17.2	2	1	RS	2010
P24-32.4	3	1	RS	2010
P24-17.1	2	1	RS	2010
P24-15.4	1	1	RS	2010
PU48	40	6	RS	2010
P24-25.2	44	8	PR	2011
P24-28.1	45	8	PR	2011
P44-91.5	51	10	SC	2011
P35-55.8	15	3	PR	2010
PU60	42	6	RS	2010
P02-45.1	60	12	PR	2012
P02-45.2	60	12	PR	2012
P02-45.4	60	12	PR	2012
P02-45.5	60	12	PR	2012
P24-32.2	3	1	RS	2010
P18-87	25	5	SC	2011
P03-45.5	62	13	SC	2012
P6/8-96.2	21	4	RS	2011
P24-36.1	46	8	PR	2011
P55B-63.5	54	11	MT	2011
P35-28.8	11	3	PR	2010
P6/8-45.5	17	4	RS	2011
P6/8-55.5	20	4	RS	2011
P6/8-55.4	20	4	RS	2011
P24-42.1	7	1	RS	2010
P24-42.4	7	1	RS	2010
P44-166.1	53	10	SC	2011
P44-166.2	53	10	SC	2011
P44-166.3	53	10	SC	2011
P44-166.4	53	10	SC	2011
PU39	37	6	RS	2010
P02-34.5	59	12	PR	2012
P24-36.2	46	8	PR	2011
P24-25.4	44	8	PR	2011
P24-25.5	44	8	PR	2011
P24-25.3	44	8	PR	2011
P35-55.7	15	3	PR	2010
P6/8-54.1	19	4	RS	2011
P35-28.5	11	3	PR	2010
P35-28.6	11	3	PR	2010
P03-44.1	61	13	SC	2012
P03-44.2	61	13	SC	2012
P03-44.3	61	13	SC	2012
P03-44.4	61	13	SC	2012
P03-45.4	62	13	SC	2012
P02-29.4	56	12	PR	2012
P6/8-44.5	16	4	RS	2011
P6/8-45.2	17	4	RS	2011
P24-17.4	2	1	RS	2010
P6/8-96.3	21	4	RS	2011
P6/8-44.2	16	4	RS	2011
P02-34.1	59	12	PR	2012
P164/25	43	7	MG	2010
P02-34.3	59	12	PR	2012
P02-34.4	59	12	PR	2012
P82/1.1	49	9	MT	2011
P82/1.2	49	9	MT	2011
P82/1.3	49	9	MT	2011
P02-29.5	56	12	PR	2012
P6/8-45.3	17	4	RS	2011

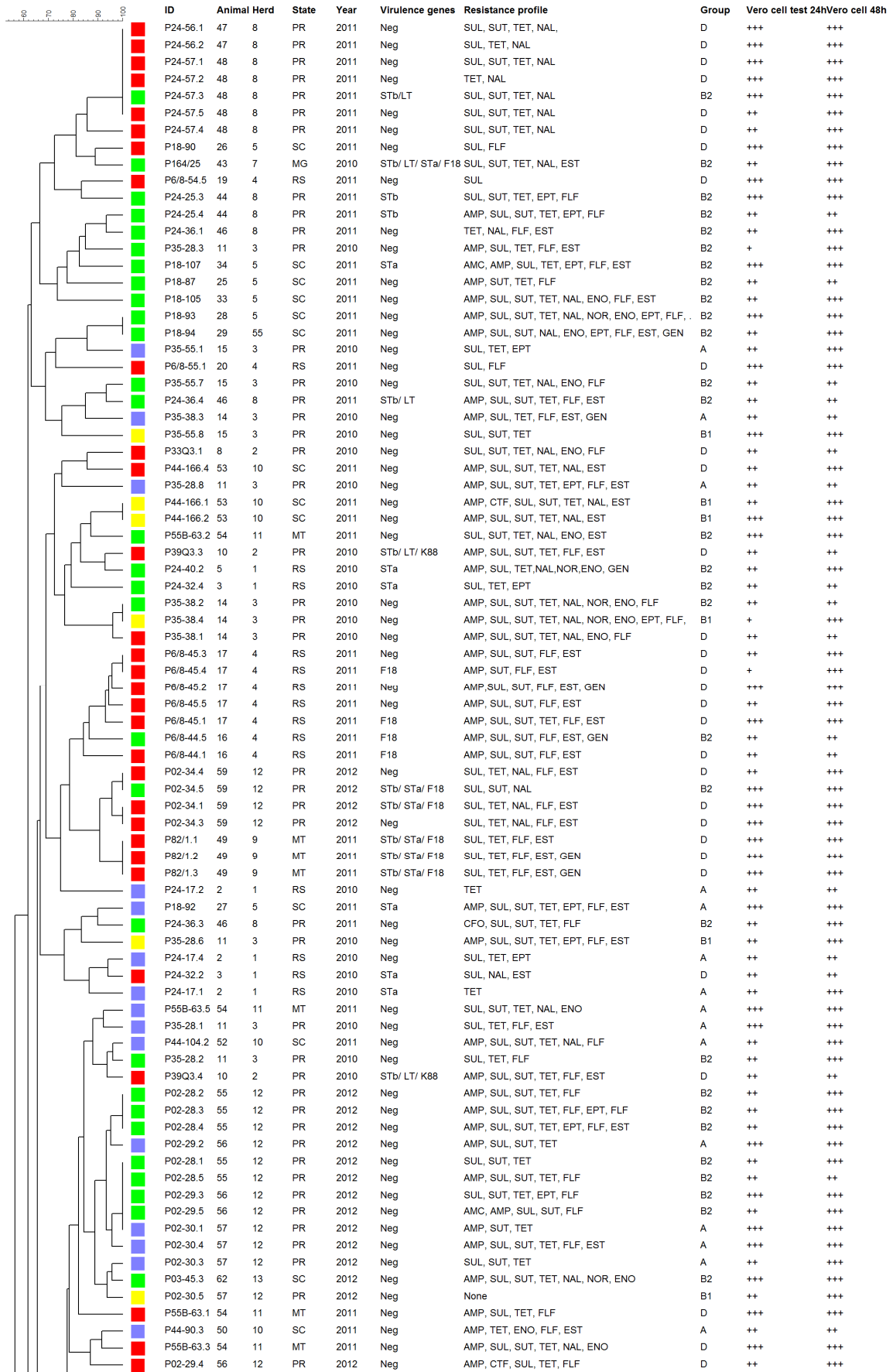
A caracterização dos isolados através do SE-AFLP gerou 79 perfis formados por 1 a 7 cepas com similaridade igual ou maior a 90%. As cepas apresentaram de 8 a 26 bandas com tamanho variando entre 300 pb e 10 Kb. O índice discriminatório na análise pela SE-AFLP foi igual a 0,99.

As bandas formadas através do SE-AFLP foram bastante nítidas e fáceis de avaliar através do programa Bionumerics 6.6, o que pode ser verificado na figura 6.

Os resultados obtidos através da SE-AFLP são ilustrados pelas figuras 5 e 6. Como pode ser observado nos dendrogramas não houve correlação entre os agrupamentos formados e a classificação proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Em vários casos ocorreu a reunião de cepas do mesmo animal e de mesma granja com 90 a 100% de similaridade. A correlação dos perfis de resistência e dos agrupamentos pode ser observada em alguns grupos formados.

Figura 5 - Dendrograma criado para análise dos resultados do SE-AFLP baseado no coeficiente de Dice e UPGMA. Cepas de *E. coli* *Stx2_e* positivas. Caixas coloridas evidenciam os grupos em que as cepas foram classificadas (grupos A-rosa, B1- amarelo, B2- verde e D-vermelho).

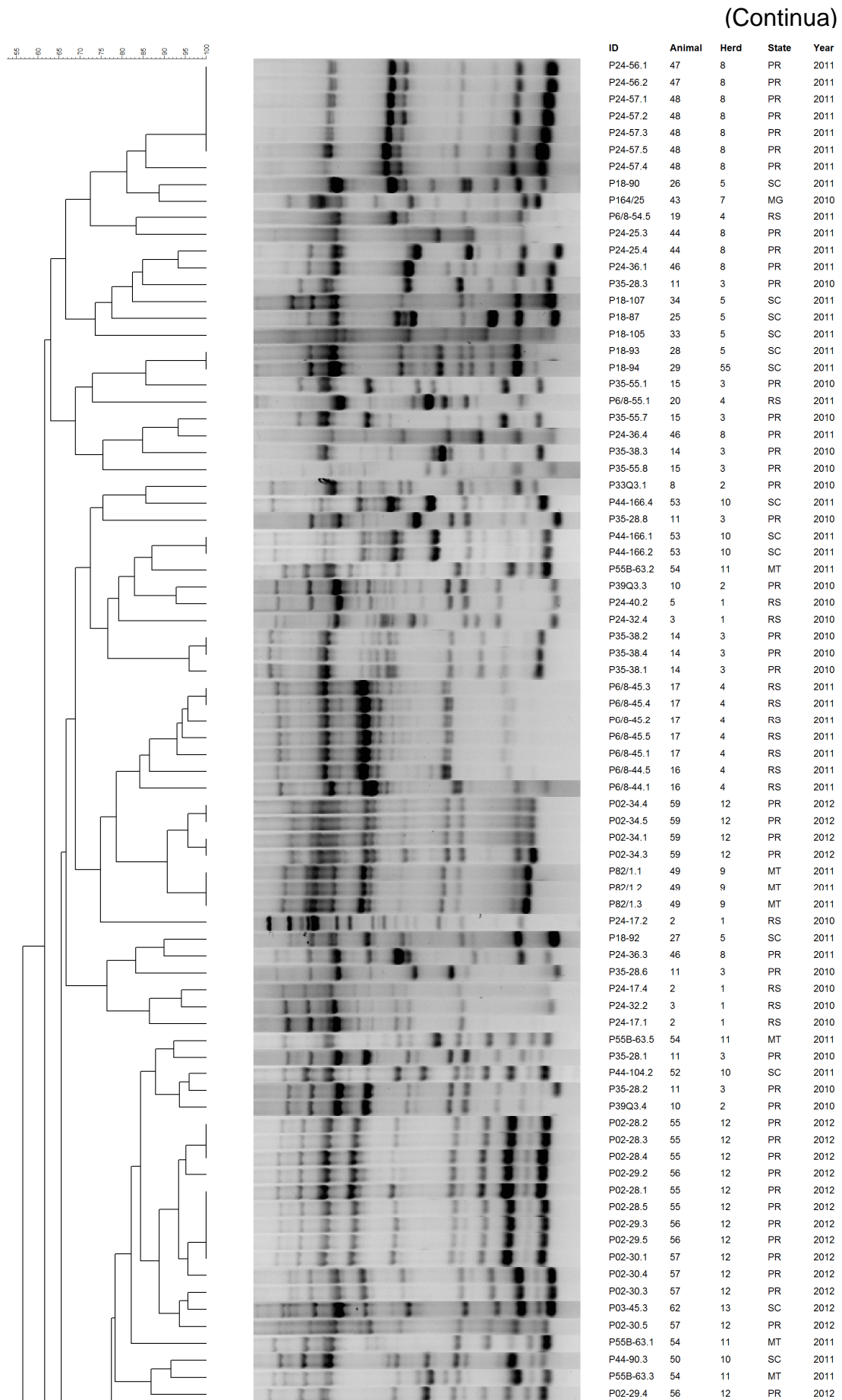
(Continua)

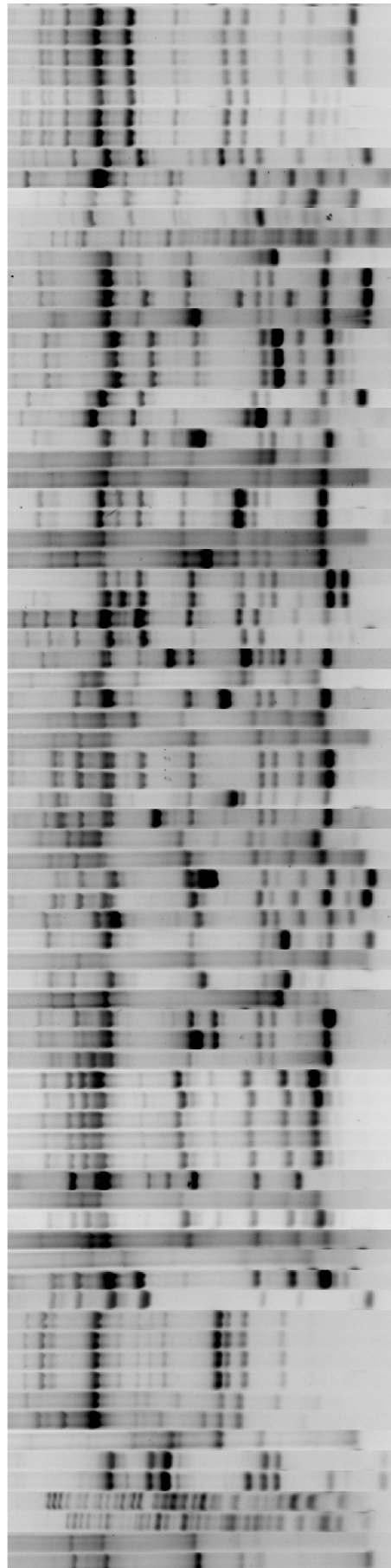
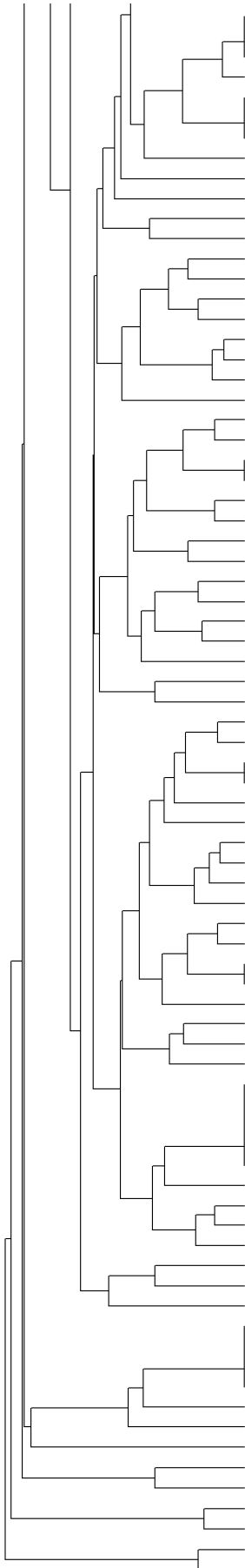


(Conclusão)

P35-36.1	13	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, FLP, EST	A	++	+++
P35-36.3	13	3	PR	2010	Neg	SUL, TET, FLP	A	++	++
P35-36.4	13	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, FLP, EST	B2	+++	+++
P35-36.5	13	3	PR	2010	Neg	AMP, TET, FLP, EST	A	++	++
P35-32.5	12	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, EPT, FLP, EST, GEN	B2	++	+++
P35-32.6	12	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, EPT, FLP, EST	A	++	++
P35-32.7	12	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, FLP, EST	A	++	++
P35-32.3	12	3	PR	2010	Neg	SUL, SUT, TET, NAL, ENO, FLP	A	+++	+++
P38Q3.3	9	2	PR	2010	Neg	None	B2	+	++
P02-30.2	57	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP	A	+++	+++
P38Q3.1	9	2	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, EPT, FLP	B2	++	++
P38Q3.4	9	2	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, FLP	B2	++	++
P6/8-54.1	19	4	RS	2011	Neg	SUL, TET	D	++	+++
P18-30	22	5	SC	2011	Neg	AMP, SUL, TET, NAL, ENO	D	++	++
P18-75	23	5	SC	2011	Neg	SUL, SUT, TET, FLP	D	++	++
P18-109	35	5	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, ENO, EPT, FLP	A	+++	+++
P03-44.2	61	13	SC	2012	STb	CTX, TET	A	+++	+++
P03-44.4	61	13	SC	2012	STb	TET	A	++	+++
P03-44.3	61	13	SC	2012	STb	TET	A	++	+++
P24-41.2	6	1	RS	2010	STb/ STa	AMP, SUL, SUT, NAL, EST	D	+	++
P38Q3.2	9	2	PR	2010	Neg	TET, FLP	B2	++	++
P24-36.2	46	8	PR	2011	Neg	SUL, SUT, FLP	D	+	++
P03-44.1	61	13	SC	2012	STb	SUL	A	++	++
P18-103	32	5	SC	2011	Neg	SUL, SUT, TET, EPT, EST	B2	++	++
P24-42.1	7	1	RS	2010	Neg	SUL, TET, FLP	D	+	++
P24-42.4	7	1	RS	2010	Neg	TET, FLP, EST	B2	++	++
P18-96	30	5	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, ENO, FLP, EST	B2	++	+++
P18-97	31	5	SC	2011	Neg	AMP, SUL, TET, NAL, FLP, EST	B2	+++	+++
P24-25.2	44	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	B2	+++	+++
P24-25.5	44	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, TET, FLP	B2	++	++
P35-32.1	12	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, FLP, EST	A	++	+++
P35-32.2	12	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, TET, EPT, FLP, EST, GEN	A	+++	+++
PU39	37	6	RS	2010	STb/ LT/ K88	SUT, TET, NAL	A	++	++
P55B-63.4	54	11	MT	2011	Neg	NAL, NOR, ENO	D	+++	+++
P18-85	24	5	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP	B2	++	++
P02-33.2	58	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	A	+++	+++
P02-45.5	60	12	PR	2012	STb	TET, FLP	B2	++	+++
P6/8-55.4	20	4	RS	2011	STb/ STa	SUL, TET	D	+++	+++
P6/8-55.5	20	4	RS	2011	STb/ STa	SUL, TET	A	++	++
P6/8-47.5	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	D	+++	+++
PU35	36	6	RS	2010	STb/ STa	TET	A	+++	+++
P44-90.1	50	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	A	++	+++
P02-45.1	60	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP	B2	++	+++
P03-45.5	62	13	SC	2012	STb	AMP, SUL, TET, NAL, ENO, EPT	B2	++	+++
P02-45.2	60	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP	B2	+++	+++
P03-45.2	62	13	SC	2012	Neg	SUL, TET, NAL	B2	+++	+++
PU48	40	6	RS	2010	STb/ LT	SUL, SUT, TET, NAL, EST	A	++	++
P02-45.4	60	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP	B2	++	++
PU41	39	6	RS	2010	STb/ LT/ K88/ Sta	AMP, SUL, TET, NAL, EST, GEN	A	++	+++
PU40	38	6	RS	2010	Neg	SUL, TET, NAL, EPT, EST, GEN	A	++	+++
P6/8-96.2	21	4	RS	2011	Neg	SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	D	++	+++
P6/8-96.3	21	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, EST	D	++	++
P6/8-54.4	19	4	RS	2011	Neg	SUL, SUT, EST	B2	+++	+++
P44-91.1	51	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	B2	++	+++
P44-91.2	51	10	SC	2011	Neg	AMP, SUT, TET, NAL, FLP, EST	A	++	+++
P44-91.3	51	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	A	++	+++
P44-91.4	51	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	A	+++	+++
P44-91.5	51	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	A	+++	+++
P24-35.3	4	1	RS	2010	STa	AMP, SUL, TET, NAL, NOR, ENO, GEN	D	+++	+++
P44-90.2	50	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP	B2	++	+++
P44-90.4	50	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, FLP, EST	A	++	+++
P03-45.4	62	13	SC	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, ENO	B2	+++	+++
P02-29.1	56	12	PR	2012	Neg	SUL, SUT, TET	B2	++	+++
P02-33.3	58	12	PR	2012	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	A	+++	+++
P24-15.4	1	1	RS	2010	Neg	SUL, TET,	B2	++	+++
P6/8-47.1	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	D	++	+++
P6/8-47.2	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	D	++	++
P6/8-47.3	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	D	+	++
P6/8-47.4	18	4	RS	2011	Neg	AMP, SUT, TET, FLP, EST	D	+	++
P6/8-44.2	16	4	RS	2011	STb	SUL, TET, FLP, EST	B2	++	++
P6/8-44.4	16	4	RS	2011	Neg	SUL, SUT, TET, NAL, EPT, FLP, EST	B2	++	++
P44-166.3	53	10	SC	2011	Neg	AMP, SUL, TET, NAL, EST	D	++	+++
PU51	41	6	RS	2010	STb/ LT/ K88	SUL, NAL, GEN	B2	++	++
PU60	42	6	RS	2010	STb/ LT/ K88	SUL, SUT, TET,	B2	+++	+++
P24-28.1	45	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, FLP, EST	B2	++	+++
P24-28.4	45	8	PR	2011	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, NAL, EST	B2	++	++
P35-28.4	11	3	PR	2010	Neg	SUL, SUT, TET, EST	B2	+++	+++
P35-28.5	11	3	PR	2010	Neg	AMP, SUL, SUT, TET, EPT, EST	B2	+++	+++

Figura 6 - Dendrograma criado para análise dos resultados do SE-AFLP baseado no coeficiente de Dice e UPGMA. Cepas de *E. coli* Stx2_e positivas. Detalhe dos padrões de bandas observados no gel de agarose





P35-36.1	13	3	PR	2010
P35-36.3	13	3	PR	2010
P35-36.4	13	3	PR	2010
P35-36.5	13	3	PR	2010
P35-32.5	12	3	PR	2010
P35-32.6	12	3	PR	2010
P35-32.7	12	3	PR	2010
P35-32.3	12	3	PR	2010
P38Q3.3	9	2	PR	2010
P02-30.2	57	12	PR	2012
P38Q3.1	9	2	PR	2010
P38Q3.4	9	2	PR	2010
P6/8-54.1	19	4	RS	2011
P18-30	22	5	SC	2011
P18-75	23	5	SC	2011
P18-109	35	5	SC	2011
P03-44.2	61	13	SC	2012
P03-44.4	61	13	SC	2012
P03-44.3	61	13	SC	2012
P24-41.2	6	1	RS	2010
P38Q3.2	9	2	PR	2010
P24-36.2	46	8	PR	2011
P03-44.1	61	13	SC	2012
P18-103	32	5	SC	2011
P24-42.1	7	1	RS	2010
P24-42.4	7	1	RS	2010
P18-96	30	5	SC	2011
P18-97	31	5	SC	2011
P24-25.2	44	8	PR	2011
P24-25.5	44	8	PR	2011
P35-32.1	12	3	PR	2010
P35-32.2	12	3	PR	2010
PU39	37	6	RS	2010
P55B-63.4	54	11	MT	2011
P18-85	24	5	SC	2011
P02-33.2	58	12	PR	2012
P02-45.5	60	12	PR	2012
P6/8-55.4	20	4	RS	2011
P6/8-55.5	20	4	RS	2011
P6/8-47.5	18	4	RS	2011
PU35	36	6	RS	2010
P44-90.1	50	10	SC	2011
P02-45.1	60	12	PR	2012
P03-45.5	62	13	SC	2012
P02-45.2	60	12	PR	2012
P03-45.2	62	13	SC	2012
PU48	40	6	RS	2010
P02-45.4	60	12	PR	2012
PU41	39	6	RS	2010
PU40	38	6	RS	2010
P6/8-96.2	21	4	RS	2011
P6/8-96.3	21	4	RS	2011
P6/8-54.4	19	4	RS	2011
P44-91.1	51	10	SC	2011
P44-91.2	51	10	SC	2011
P44-91.3	51	10	SC	2011
P44-91.4	51	10	SC	2011
P44-91.5	51	10	SC	2011
P24-35.3	4	1	RS	2010
P44-90.2	50	10	SC	2011
P44-90.4	50	10	SC	2011
P03-45.4	62	13	SC	2012
P02-29.1	56	12	PR	2012
P02-33.3	58	12	PR	2012
P24-15.4	1	1	RS	2010
P6/8-47.1	18	4	RS	2011
P6/8-47.2	18	4	RS	2011
P6/8-47.3	18	4	RS	2011
P6/8-47.4	18	4	RS	2011
P6/8-44.2	16	4	RS	2011
P6/8-44.4	16	4	RS	2011
P44-166.3	53	10	SC	2011
PU51	41	6	RS	2010
PU60	42	6	RS	2010
P24-28.1	45	8	PR	2011
P24-28.4	45	8	PR	2011
P35-28.4	11	3	PR	2010
P35-28.5	11	3	PR	2010

6 DISCUSSÃO

A doença do edema causada pela *E. coli* produtora de toxina Stx2e tem sido descrita em diferentes Estados do Brasil há muitos anos vem causando grandes prejuízos a suinocultura nacional (SILVA et al., 2001; VIDOTTO et al., 2009; COSTA et al., 2010). Várias vacinas experimentais foram descritas para prevenir a doença, mas até o momento não há vacinas comerciais disponíveis (OANH et al., 2012).

No presente estudo 158 cepas de *E. coli* positivas para a presença do gene codificador da toxina Stx2e foram caracterizadas através de provas fenotípicas e genotípicas. A avaliação do padrão de resistência indicou uma alta frequência de resistência à tetraciclina (87,3%), seguida pela resistência a sulfonamidas (86%), florfenicol (62,6%), cotrimoxazol (58,8%), ampicilina (55,7%) e estreptomicina (50,6%).

Segundo OANH et al. (2010), estudos realizados no Vietnã com cepas de *E. coli* Stx2e+ revelam resultados semelhantes com alta prevalência de resistência a tetraciclina (100%), cotrimoxazol (98,4%) e estreptomicina (70,4%).

Os níveis altos de resistência aos antimicrobianos citados anteriormente, também foram obtidos na Coreia por Choi et al. (2002), no Brasil por Baccaro et al. (2002), na Austrália por Smith et al. (2010), na China por Yang et al. (2004) e Wang et al. (2011). Em todos os estudos citados, incluindo o presente foi observada baixa ou nenhuma resistência ao ceftiofur e a outras cefalosporinas.

A resistência a florfenicol têm sido avaliada em vários países nos últimos anos, por ser um antimicrobiano de uso relativamente recente em produção animal. No presente estudo foram identificadas 62,7% (99/158) das cepas resistentes a este antimicrobiano. Wang et al. (2011) relata uma ocorrência ligeiramente inferior de resistência ao florfenicol, representando 58% (59/102) das cepas de *E. coli* avaliadas.

O fenômeno de multirresistência tem sido descrito como um grande problema na escolha dos antimicrobianos para o tratamento metafílico da doença do edema (WANG et al. 2011). No presente estudo foram observadas 83,5% (132/158) das cepas apresentando resistência a três classes de antimicrobianos ou mais. Resultados semelhantes são descritos por Wang et al. (2011) em estudo realizado

na China com cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia ou doença do edema. Estes autores descrevem 98% (100/102) das cepas resistentes a mais de três classes de antimicrobianos.

A associação do gene *stx2_e* com outros genes codificadores de fímbrias e toxinas é amplamente descrita na literatura (SILVA et al., 2001; VIDOTTO et al, 2009) A principal fímbria descrita em associação à toxina Stx2e é a F18, no entanto, dentre as 158 cepas aqui estudadas houve uma baixa ocorrência de fímbria F18 e de outros fatores de virulência. Este achado deve estar relacionado ao fato de nem todos os animais examinados para a seleção das cepas apresentarem o quando de doença do edema, parte dos animais examinados apresentava diarreia pós-desmame ou era portador do agente.

Apesar da baixa frequência dos genes de virulência associados a doença do edema e diarreia pós desmame, foi observada a expressão da toxina Stx2e em 100% das cepas estudadas. Em estudo conduzido por Silva et al. (2001) com cepas de *E. coli* positivas para presença do gene *stx2_e*, apenas 45,4% (45/99) das cepas produziram a toxina em células Vero e Hela. O efeito citotóxico observado em 24 e 48 horas variou em intensidade, mas na maioria das cepas (68,9% - 109/158) atingiu o maior grau de lesão (+++).

A diferença entre estes resultados pode estar relacionada a diferenças no desenho dos primers utilizados nos dois estudos, sendo que a reação positiva pode em alguns casos não corresponder ao gene funcional. No presente estudo foi realizada a PCR para detecção do gene *stx2_e* com os primers descritos por Zhang et al. (2007) e no estudo realizado por Silva et al. (2001) foram utilizados primers descritos por Blanco et al. (1997).

Estudos realizados com a coleção internacional de cepas de *E. coli* ECOR mostrou que as cepas desta espécie se distribuem em quatro grupos filogenéticos principais denominados A, B1, B2 e D. Os grupos A e B1 são formados na maioria dos estudos por cepas pertencentes a microbiota intestinal ou causadoras de diarreia. As cepas com características extra-intestinais são pertencentes em maior frequência aos grupos B2 e em menor extensão ao grupo D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

A caracterização das cepas através da pesquisa dos genes propostos por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) resultou na distribuição das cepas *stx2_e* + de origem suína nos quatro grupos com as seguintes frequências: grupo A 27,2%

(43/158), grupo B1 3,8% (6/158), grupo B2 39,2% (62/158), grupo D 29,8% (47/158). Estes resultados sugerem que 69% das cepas poderiam ter capacidade de sobreviver em ambientes extra intestinais.

Ao contrário do observado neste estudo, Girardeau et al. (2005), analisaram 287 cepas de *E. coli* STEC de diferentes origens sendo que as mesmas foram distribuídas principalmente no grupo B1 (70%), seguido pelo grupo A (19%), pelo grupo D (10%) e B2 (1%).

A caracterização de cepas de *E. coli* causadoras de doença do edema através da PFGE já foi descrita previamente por diferentes autores (VU-KHAC et al., 2007; WANG et al., 2011). Através desta técnica foi possível caracterizar todas as cepas e verificar que a associação mais frequente se refere à origem das mesmas, seja em relação aos animais ou a propriedade de origem. Este tipo de associação também são descritos nos estudos citados por Vu-Khac et al. (2007) e Wang et al. (2011).

A caracterização genotípica de agentes bacterianos através do SE-AFLP tem sido relatada em vários estudos e em cepas de *E. coli* foi descrita pela primeira vez na discriminação de cepas de origem aviária por Knobl et al. (2012). Os resultados obtidos nas 158 cepas produtoras de toxina Stx2e foram semelhantes ao observado na caracterização pela PFGE, no entanto, os padrões obtidos na SE-AFLP são mais facilmente visualizados e avaliados através do programa Bionumerics 6,6. A associação observada com maior clareza é relativa ao animal e granja de origem e com o grupo filogenético.

Ambas as técnicas de caracterização genotípica apresentaram altos índices discriminatórios, 0,98 para PFGE e 0,99 no caso do SE-AFLP. Estes índices revelam não só a capacidade das técnicas em discriminar as cepas, mas também a grande variabilidade das cepas de *E. coli*, apesar de pertencerem a um patotipo definido, STEC e de serem altamente especializadas em relação ao hospedeiro, o suíno. Isolados de *E. coli* carregando o gene *stx2_e* já foram descritos em ambiente e amostras de fezes de humanos com diarreia e síndrome hemolítico-urêmica, no entanto, o quadro característico da doença do edema só é descrito na espécie suína.

7 CONCLUSÃO

1. A identificação das cepas positivas para *stx2_e* através da PCR com os primers utilizados no presente estudo apresentou 100% de concordância com a expressão da toxina em cultivo celular.
2. O fenômeno de multirresistência foi observado em mais de 80% das cepas estudadas reafirmando a necessidade do uso consciente de antimicrobianos na produção animal.
3. A caracterização das cepas através da determinação do grupo filogenético demonstrou que apesar da origem intestinal, 69% dos isolados foram reunidos nos grupos B2 e D, que são geralmente relacionados a infecções extra intestinais, de maior potencial de patogenicidade.
4. As duas técnicas genotípicas avaliadas (PFGE e SE-AFLP) apresentaram alto índice discriminatório e ambas apresentaram maior tendência a agrupar as cepas de acordo com o animal e a granja de origem.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; JORSAL, S. E.; AHRENS, P.; JENSEN, N. E.; MEYLING, A. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 20-24, 1997.
- BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ, E. A.; MORA A.; JANSEN, W.; GOMES, T. A.; ZERBINI, L.F.; YANO, T.; CASTRO, A. F.; BLANCO, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2958-2963, 1997.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia após o desmame. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 43, p. 133-137, 2000.
- BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C.; PIFFER, I. A.; LEITE, S. S.; SILVA, A. B. Virulência de *Escherichia coli* O139:K82. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 119-122, 2001.
- CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. Frequencia de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico.**, v. 68, p. 29-34, 2001.
- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 214-226, 2012.
- CHENG, D.; SUN, H.; XU, J.; GAO, S. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 320–328, 2006.

CHOI, C.; HAM, H. J.; KWON, D.; KIM, J.; CHEON, D. S.; MIN, K.; CHO, W. S.; CHUNG, H. K.; JUNG, T.; JUNG, K.; CHAE, C. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 1, p. 71-73, 2002.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

COSTA, M. M.; DRESCHER, G.; MABON, F.; WEBE, S. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHARANK, I. S.; VARGAS, A. C. Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 30-36, 2010.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A. L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **Journal Infect Disease**, v. 183, n. 1, p. 78-88, 2001.

FAIRBROTHER, J. M. Enteric cobacillosis. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.) **Diseases of Swine**. 7. ed. Ames: The Iowa State University, 1992. p. 489-97.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 17-39, 2005.

FAUBERT, C.; DROLET, R. Hemorrhagic gastroenteritis caused by *Escherichia coli* in piglets: clinical, pathological and microbiological findings. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, p. 251-256, 1992.

FRANK, J. How the ribosome works. **American Science**, v. 86, p. 428-439, 1998.

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

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2001.

GARABAL, J. I.; GONZALEZ, E. A.; VASQUEZ, F.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E. Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 113-123, 1996.

GIRARDEAU, J. P.; DALMASSO, A.; BERTIN, Y.; DUCROT, C.; BORD, S. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 6098–6107, 2005.

GUINÉE, P. A. M.; AGTERBER C. M.; JANSEN, H. W. *Escherichia coli* O typing by means of a mechanized microtechnique. **Applied Microbiology**, v. 24, p. 127-131, 1972.

GYLES, C. L. ***Escherichia coli* in domestic animals and human**. Wallingford: CAB International, 1994. 672 p.

HA, S. K.; CHOI, C.; CHAE, C. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 378–381, 2003.

HELGERSON, A. F.; SHARMA, V.; DOW, A. M.; SCHROEDER, R. Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3074-3077, 2006.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

IMBERECHTS, H.; GREVE, H. D.; LINTERMANS, P. The pathogenesis of edema disease in pigs: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 221-233, 1992.

KNOBL, T.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIRA, A. J. P. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. **The ScientificWorld Journal**, v. 4, p. 1-7, 2012

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

LANG, A. L.; TSAI, Y.; MAYER, C. L.; PATTON, K. C.; PALMER, C. J. Multiplex PCR for detection of the heat – labile toxin gene and Shiga – like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60 n. 9, p. 3145–3149, 1994.

LEVINE, M. M.; XU, J.; KAPER, J. B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, I.K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal Infection Disease**, v.156, p.175-182, 1987.

MACKINNON, J.D. Enteritis in the young pig caused by *Escherichia coli*. **The Pig Journal**, v. 41, p. 227–255, 1997.

MAINIL, M. G.; MOSELEY, S. L.; SCHNEIDER, R. A.; SUTCH, K.; CASEY, A.; MOON, H. W. Hibridization of bovine isolates with gene probes for four enterotoxins (StaP, StaH, STb, LT) and one adhesion factor(K99). **Veterinary Research**, v. 47, n. 5, p. 1145–1148, 1991.

MARQUES, L. R. M.; PEIRIS, J. S. M.; CRYZ, S. J.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. **FEMS Microbiology Lett**, v. 44, p. 33-38, 1987.

MCLAUHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

NABUURS, M. J. A.; VANZIJDERVERELD, F. G. Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhoea in pigs at weaning. **Research in Veterinary Science**, v. 55, p. 70–77, 1993.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suceptibility tests for bactéria isolated from animals; Aproved standard- Second Edition. NCCLS document M31-A3. 2008. USA.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPELYARD, G.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER, J. M. 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, p. 242-252, 2003.

NIWERTH, U.; FREY, A.; VOSS, T.; BOUGUE´NEC, C. L.; BALJER, G.; FRANKE, S.; SCHMIDT, M. A. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 143-149, 2001.

OANH, T. K. N.; NGUYEN, V. K.; DO, T. N.; GODDEERIS, B. M.; GREVE, H. D. *Escherichia coli* strains causing edema disease in northern Vietnam share an identical verotoxin 2e. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 8, p. 1797-1804, 2010.

OANH, T. K. N.; NGUYEN, V. H.; GREVE, H. D.; GODDEERISA, B. M. Protection of Piglets against Edema Disease by Maternal Immunization with Stx2e Toxoid. **American Society for Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 469–473, 2012.

OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **Journal of Bacteriology**, v. 157, n. 2, p. 690-693, 1984.

OSEK, J. Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p.211-222, 2000.

PARMA, A. E.; SANZ, M. E.; VIÑAS, M. R.; CICUTA, M. E.; BLANCO, J. E.; BOEHRINGER, S. I.; VENA, M. M.; ROIBON, W. R.; BENITEZ, M. C.; BLANCO, J.; BLANCO, M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 269-276, 2000.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology**, v. 11, p. 450–479, 1998.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.;BLAKE, P. A. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal Medicine**, v. 12, p. 681-685, 1983.

SEARS, C. L.; KAPRE, J. B. Enteric bacterial toxin: mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v. 60, n. 1, p. 186-199, 1996.

SILVA, A. S.; VALADARES, G. F.; PENATTI, M. P. A.; BRITO, B. G.; LEITE, D. S. *Escherichia coli* strains from edema disease: O serogroups, and genes for Shiga toxin, enterotoxins, and F18 fimbriae. **Veterinary Microbiology**, v.80, p. 227-233, 2001.

SKURNIK, D.; LE MENAC'H, A.; ZURAKOWSKI, D.; MAZEL, D.; COURVALIN, P.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy

subjects free of recent antibiotic exposure. **Antibiogram Agents Chemother**, v. 49, p. 3062-3065, 2005.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 4, p. 134-163, 2007.

SMITH, M. G.; JORDAN, D.; CHAPMAN, T. A.; CHIN, J. J. C.; BARTON, M. D.; DO, T. N.; FAHY, V. A.; FAIRBROTHER, J. M.; TROTT, D. J. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistance enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 299-307, 2010.

TANG, X.; TAN, C.; ZHANG, X.; ZHAO, Z.; XIA, X.; WU, B.; GUO, A.; ZHOU, R.; CHEN, H. Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, p. 207-212, 2011.

TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005, 780 p.

UGRINOVICH, L. A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 297–306, 2007.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology Infection**, v. 13, p. 1-46, 2007.

VIDOTTO, M. C.; LIMA, N. C. S.; FRITZEN, J. T. T.; FREITAS, J. C.; VENÂNCIO, M. J.; ONO, M. A. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 199-204, 2009.

VU-KHAC, H.; HOLODA, E.; PILIPCINEC, E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; LOPÉZ, C.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. **The Veterinary Journal**, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2007.

WANG, X. M.; LIAO, X. P.; LIU, S. G.; ZHANG, W. J.; JIANG, H. X.; ZHANG, M. J.; ZHU, H. Q.; SUN, Y.; SUN, J.; LI, A. L.; LIU, Y. H. Serotypes, virulence genes, and

antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 687-692, 2011.

WOODWARD, M. J.; KEARSLEY, R.; WRAY, C.; ROEDER, P. L. DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* Isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. **Veterinary Microbiology**, v.22, p.277 – 290, 1990.

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, p. 251–261, 1992.

WRAY, C.; WOODWARD, M. J. *Escherichia coli* infections on farm animals. In: SUSSMAN, M. (Ed.) **Escherichia coli: mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University, 1997. p. 49-84.

YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D. G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial resistance *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of clinical Microbiology**, v. 42, p. 3483-3489, 2004.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 145–152, 2007.

ZHU, C.; HAREL, J.; JACQUES, M.; FAIRBROTHER, J. M. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 from swine with postweaning diarrhea. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 59, p. 118 – 123, 1995.

ZMEIFEL, C.; SCHUMACHER, S.; BEUTIN, L.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 328-332, 2006.