



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINA GALDINO GUMIERO RIBEIRO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA EM SUÍNOS NA REGIÃO NORTE DO
PARANÁ**

Londrina
2018

CAROLINA GALDINO GUMIERO RIBEIRO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA EM SUÍNOS NA REGIÃO NORTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ribeiro, Carolina Galdino Gumiero.

Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* diarreiogênica em suínos na região norte do Paraná / Carolina Galdino Gumiero Ribeiro. - Londrina, 2018.
63 f.

Orientador: Gerson Nakazato.

Coorientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* - Tese. 2. DEC - Tese. 3. suinocultura - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CAROLINA GALDINO GUMIERO RIBEIRO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
DIARREIOGÊNICA EM SUÍNOS NA REGIÃO NORTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª Drª Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª Drª Ana Angelita Sampaio Baptista
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os envolvidos neste trabalho, que contribuíram de alguma maneira para minha formação, acadêmica e pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela orientação e por entender a necessidade de médicos veterinários na área de pesquisa, por todo o apoio e incentivo, e por mostrar que a pesquisa é possível para todos que a buscam. Por sempre aparecer de bom humor, e ao mesmo tempo se preocupar com os orientados e alunos do laboratório, com seriedade.

À Prof. Dr. Renata K. T. Kobayashi, por participar, mesmo que indiretamente, como coorientadora neste trabalho, pelo suporte e pelas instruções ao longo de dois anos de muito aprendizado. Por, na ausência de meu orientador, sempre se mostrar presente e disposta a ajudar em vários aspectos do projeto e também na vida.

Aos colegas e amigos do laboratório NIP3, que ajudaram de alguma forma, nas coletas realizadas, nos ensinamentos ao longo dos dois anos de mestrado, na paciência e no acolhimento de uma nova pessoa no laboratório, e principalmente, na diversão e alegria que tive todos os dias no laboratório. Ao conviver com todas estas pessoas, percebi que a pesquisa não é feita sozinha, e que precisamos ajudar uns aos outros sempre que pudermos. Sem a ajuda que tive, não teria chegado até aqui.

Aos professores e amigos da veterinária que me ajudaram de alguma maneira neste projeto, incentivando e se interessando da mesma forma pela pesquisa.

À minha família, especialmente à meu pai, João, que me ajudou e participou de coletas, e entendeu que este trabalho é uma continuidade de mais de cinco anos de estudos na veterinária.

À minha mãe, Claudécir, e às minhas irmãs, Luciana e Heloisa, por não me deixarem desistir, me dando conselhos e direcionamentos na vida.

À todas estas pessoas que me mostraram que devemos persistir e não deixar de acreditar que podemos ser melhores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Por estes e por muitos outros motivos que me trazem alegria, o meu **muito obrigada**.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

RIBEIRO, Carolina Galdino Gumiero. **Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* diarreio gênica em suínos na região norte do paraná.** 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2018.

RESUMO

Escherichia coli diarreio gênica (DEC) representa um dos principais agentes causadores de diarreia em suínos. As enterites bacterianas acarretam prejuízos econmicos importantes na suinocultura brasileira, e por este motivo, o presente estudo teve como objetivo, isolar DEC de suínos, e caracterizar seus principais genes de virulência, resistência aos antimicrobianos e capacidade de adesão em células HeLa. Um total de 172 cepas de *E. coli* foram isoladas, a partir de 87 animais, de 10 granjas de suínos na região norte do estado do Paraná. Dessas amostras, 76% apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos, tendo destaque para o Sulfametoxazol + Trimetoprima (60%), e Tetraciclina (56%). No ensaio de adesão em células HeLa, 50% das amostras apresentaram adesão do tipo localizada em células HeLa, e na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), 53 amostras apresentaram um ou mais genes de virulência de DEC. Dentre os patotipos encontrados, foram obtidos isolados de ETEC (11,6%), EAEC (6,9%), STEC (5,8%), EPEC (4,6%), EHEC (3,5%) e EIEC (1,2%), onde o gene de virulência mais encontrado foi STa, em 8,13% das amostras testadas. A presença de alguns patotipos como EIEC e EAEC, mesmo que minoritárias, nos chama a atenção, uma vez que esses patotipos estão em emergência em doenças humanas.

Palavras-chave: suinocultura; resistência antimicrobiana; colibacilose, diarreia.

RIBEIRO, Carolina Galdino Gumiero. **Isolation and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* in swine in the northern parana region.** 2018. 63 p. Dissertation (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

ABSTRACT

Diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) represents one of the main agents causing diarrhea in pigs. As bacterial enterites, it causes significant economic depressions in Brazilian pig farms, for this reason, this study aimed to isolate DEC from pigs and to characterize their main virulence genes, antimicrobial resistance and adhesion capacity in HeLa cells. A total of 172 strains of *E. coli* were isolated, from 87 animals, from 10 pig farms in the northern region of the state of Paraná. Of these samples, 76% presented resistance to at least one class of antimicrobials, with emphasis on Sulfamethoxazole + Trimethoprim (60%) and Tetracycline (56%). In the HeLa cell adhesion assay, 50% of the strains showed localized adhesion. A total of 53 strains had one or more DEC virulence genes detected by PCR. Among the pathotypes isolates, were isolated ETEC (11.6%), EAEC (6.9%), STEC (5.8%), EPEC (4.6%), EHEC (3.5%) and EIEC (1.2%) and the most virulent gene founded was STa, in 8.13% of the samples tested. The presence of some pathotypes such as EIEC and EAEC, even if minority ones, draws attention to us, since these pathotypes are in emergency in human diseases.

Keyword: swine breeding; antimicrobial resistance; colibacillosis, diarrhea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do mecanismo de ação dos patótipos de DEC	16
Figura 2 – Estágio Inicial da Infecção por EPEC.....	20
Figura 3 – Padrões de adesão em células HeLa com amostras de DEC isoladas de suínos na região norte do Paraná	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características genóticas e fenóticas de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de suínos, na região Norte do Paraná entre junho de 2016 a maio de 201749
- Tabela 2** – Perfil de resistência das amostras de *Escherichia coli* Diarreiogênicas isoladas de suínos na região norte do Paraná, no período de junho de 2016 à maio de 2017.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
BFP	Bundle Forming Pillus
DEC	<i>Escherichia coli</i> Diarreiogênica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
LT	Heat-labile enterotoxin (Toxina Termolábil)
ST	Heat-stable enterotoxins (Toxina Termoestável)
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de Toxina Shiga
Stx	Shiga-Toxina
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	A importância de <i>Escherichia coli</i> na suinocultura.....	13
2.2	<i>Escherichia coli</i> Diarreiogênica (DEC).....	15
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	17
2.2.2	<i>Escherichia coli</i> Produtora de toxina Shiga (STEC/EHEC).....	20
2.2.3	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	23
2.2.4	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)	26
2.2.5	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	29
2.3	Resistência de <i>E. coli</i> a antimicrobianos na suinocultura	30
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
4	OBJETIVOS	42
4.1	Objetivo Geral.....	42
4.2	Objetivos Específicos.....	42
5	ARTIGO CIENTÍFICO	43
6	CONCLUSÃO	56
7	APÊNDICES	60
7.1	CARY-BLAIR	60
8	ANEXOS	61
8.1	TABELAS DE INICIADORES UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE ACORDO COM SEUS RESPECTIVOS AUTORES.....	61
8.2	FICHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	63

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a suinocultura é um setor que cresce a cada ano no cenário nacional e internacional (ABPA, 2018). A importância deste setor ganha destaque quando avaliamos a espécie suína como potencial reservatório de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC), por exemplo. Responsável por diversos surtos de diarreia no Brasil e no mundo, mesmo pertencendo à microbiota de diversas espécies animais, *E. coli* pode passar de um agente comensal à um patógeno de extrema importância para a saúde pública.

E. coli é frequentemente descrita na saúde humana, em relatos de contaminação de água, e surtos de diarreia pelo mundo todo. Estudos buscando cepas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) já foram realizados em diversos países, e também em diversas espécies, ressaltando sua importância como causador de enterites graves. Em suínos, ainda são poucos os relatos descrevendo patótipos específicos de DEC, responsáveis por enterites em animais de produção. Contudo, para a espécie humana, os seus diferentes patótipos vêm ganhando cada vez mais destaque, onde são responsáveis por surtos de diarreia infantil em países em desenvolvimento, e também pelo fato de algumas cepas apresentarem multirresistência aos antimicrobianos.

A utilização de profilática de antimicrobianos na produção animal deve ser considerada uma atividade de grande risco à saúde humana e infelizmente, no setor suinícola, esta prática ainda não foi completamente proibida no Brasil. A administração de drogas antimicrobianas em suínos, seja de forma profilática, terapêutica, ou como fator de crescimento com o objetivo de bons índices produtivos, pode causar sérios problemas no controle do microrganismo.

A investigação da prevalência de DEC na área veterinária torna-se cada vez mais necessária, à medida que encontramos patótipos importantes de *E. coli* em modelos variados de propriedades criadoras de suínos, e de outros animais de produção.

O nosso grupo de pesquisa vem pesquisando tais patótipos de DEC em diferentes tipos de animais (o que incluem os humanos) como cães, gatos, bovinos, ovinos, e agora suínos. Nesse contexto, é de nosso interesse encontrar diferentes

patotipos de DEC nesses animais, e caracterizá-los genotípica e fenotipicamente, para analisarmos o seu risco zoonótico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância de *Escherichia coli* na suinocultura

A suinocultura no Brasil é um setor que cresce desde a década de 70, onde modificações no sistema de produção ocorreram com o objetivo de intensificar a produção. Tais mudanças envolveram melhorias genéticas e nutricionais, com o objetivo de aumentar e melhorar a produtividade. Apesar dos avanços em recursos e tecnologias na área, as mudanças ocorridas trouxeram também problemas como a colibacilose neonatal, diarreia pós desmame e doença dos edemas, devido à intensificação da produção que predispõe fatores ambientais e do hospedeiro (SILVA et al., 2015).

Em 2016, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil ocupava o quarto lugar no ranking mundial de produtores e exportadores de carne suína, graças aos investimentos e estudos realizados na área da suinocultura. As melhorias no manejo produtivo, no gerenciamento dos produtores e na sanidade animal, trouxeram como consequência o aumento da produção nacional tendo destaque, a região sul do país (ABPA, 2018; KICH et al., 2011). Em 2017, a carne suína brasileira teve 68,4% de seu volume total exportada para países como Rússia, China e Hong Kong, o que enfatiza a importância das melhorias alcançadas na produção suinícola no país. Contudo, na presença ou ausência de um aumento na produção de suínos, zoonoses e enterites são fatores importantes a serem estudados (ZEN et al., 2015).

Um dos períodos considerados mais críticos para o aparecimento de enterites em suínos, é o período neonatal. Nesta fase, aproximadamente 30% das perdas econômicas ocorrem (JACOBSON et al., 2003). Segundo Brum (2013), doenças de origem bacteriana são mais prevalentes e representam mais de 23% das mortes de suínos, principalmente na região dos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul. Dentre as doenças bacterianas de importância na suinocultura, destacam-se a Colibacilose neonatal, quadros de diarreia na fase pós desmame e a doença do edemas, que tem como agente etiológico principal, *Escherichia coli*.

Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1885, por Theodor Von Escherich, e faz parte da família das Enterobacteriaceae. É um bacilo Gram negativo

comum ao trato gastrointestinal de animais de sangue quente, anaeróbio facultativo e pode apresentar estruturas que conferem mobilidade e capacidade de adesão celular, como adesinas do tipo fimbriais e afimbriais. *E. coli* está presente na microbiota de humanos, bovinos, aves, suínos, entre outros animais, e não causa apenas problemas intestinais, podendo associar-se a infecções do trato urinário por exemplo (CHEN; FRANKEL, 2005; PITOUT, 2012; TANIUCHI et al, 2012).

De acordo com Silva e colaboradores (2015), o potencial de contaminação de granjas de suínos por *E. coli* em é cada vez maior, e a colibacilose é considerada a doença de maior impacto na suinocultura, devido a presença de cepas enterotoxigênicas de *E. coli* presentes na microbiota dos animais. A partir do momento em que o quadro de diarreia e desidratação é estabelecido, os suínos neonatos podem vir a óbito dentro de 12 horas a quatro dias após o nascimento (COOPER, 2000).

O aparecimento de doenças bacterianas está frequentemente ligado a fatores como manejo, ambiente e nutrição dos animais. De acordo com o estilo de criação de suínos, o local pode apresentar uma maior prevalência de doenças como colibacilose neonatal, diarreia pós desmame e doença do edema (BRUM, 2013; SOBESTIANSKY et al., 2012). A colibacilose neonatal é causada por cepas enterotoxigênicas de *E. coli* produtoras de toxinas LT (toxina termolábil) e ST (toxina termoestável), e ocorre com maior frequência na maternidade no período de 1 a 5 dias de vida dos leitões, com sintomas severos como diarreia aquosa seguida de desidratação. Ambientes com condições precárias de higiene, nutrição e manejo favorecem o aparecimento da doença (MORÉS et al., 2012). A diarreia pós desmame também conhecida como Síndrome da diarreia pós-desmame (SDPD), é multifatorial e acomete leitões em torno de duas semanas após o desmame ser iniciado. O agente principal é *E coli*, contudo, fatores nutricionais e ambientais também são importantes, bem como em outras doenças infecciosas (SOBESTIANSKY et al., 2012). Na doença do edema, o suíno apresenta inicialmente sinais clínicos diferentes de Colibacilose neonatal e diarreia pós desmame. A doença é causada por cepas de *E. coli* produtoras de Shiga-toxina, e acomete leitões entre 4 e 15 dias após o desmame, e também animais com mais de 60 dias. As toxinas produzidas atuam na parede dos vasos sanguíneos, e resultam em danos vasculares sistêmicos graves, levando o animal a óbito em pouco tempo.

Além do edema causado pela toxina, sinais clínicos como dispneia e transtornos neurológicos são observados (MORÉS e MORÉS, 2007).

A aquisição de bactérias pelos animais tem origem ambiental e materna através da via fecal-oral, e é influenciada pela ausência de defesas naturais, como a microbiota e barreira gástrica. Estes fatores somados ao estresse e à imunossupressão desempenham um papel importante na infecção (GYLES; FAIRBROTHER, 2004; HENTON; HUNTER, 1994). As perdas econômicas geradas por enterites bacterianas são altas, devido o aumento na taxa de mortalidade e morbidade, a redução no ganho de peso e os custos com tratamentos (BARCELLOS et al., 2012).

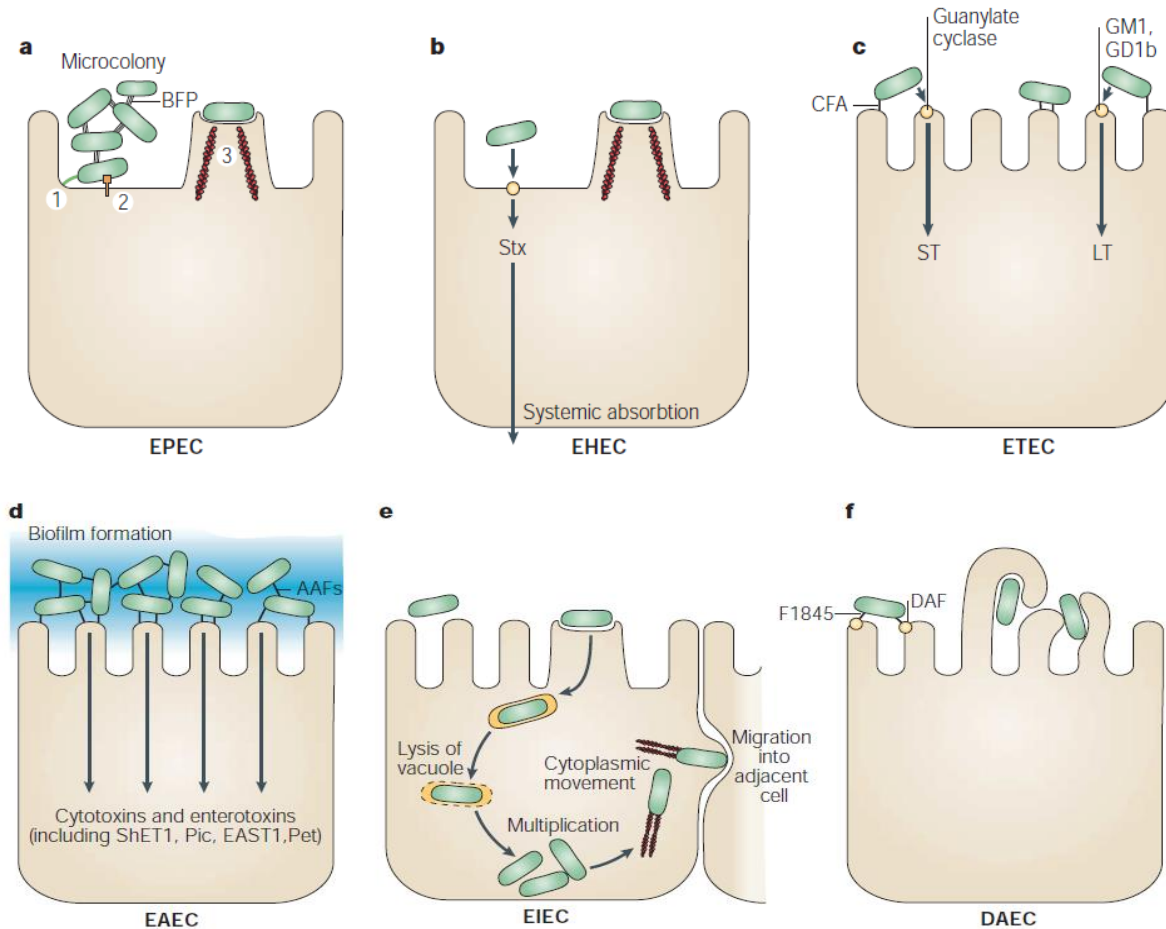
De todos os patótipos de *E. coli* diarreio gênicas (DEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é o mais importante na suinocultura, devidos aos sinais clínicos observados nos leitões nas fases neonatal e pós desmame, que levam a grandes prejuízos econômicos até o fim deste sistema produtivo (DUBREUIL, ISAACSON e SCHIFFERLI, 2016). Por este motivo, a relevância do diagnóstico de patótipos de DEC na suinocultura justifica-se pelo impacto econômico gerado na produção suinícola e na relação zoonótica que este microrganismo pode apresentar.

2.2 *Escherichia coli* Diarreio gênicas (DEC)

E. coli que causam doenças intestinais são denominadas *E. coli* diarreio gênicas, mais conhecidas como DEC e subclassificadas em *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de Aderência Difusa (DAEC), de acordo com a presença ou ausência de fatores de virulência característicos de cada patótipo (ESTRADA-GARCÍA et al., 2009; NATARO; KAPER, 1998).

Segundo Kaper, Nataro e Mobley (2004), os mecanismos que desencadeiam doenças em humanos e animais dependem diretamente de fatores de virulência associados a cada patótipo de DEC e sua adesão ao epitélio intestinal. (**Figura 1**)

Figura 1 – Esquema do mecanismo de ação dos patótipos de DEC



As seis categorias de DEC reconhecidas possuem fatores únicos em suas interações com células eucarióticas. Nesta figura, a interação de cada categoria com um alvo típico é representada esquematicamente. Estas descrições são resultados de estudos *in vitro* e podem não refletir completamente o fenômeno representado quando em células humanas infectadas. **A** | EPEC adere aos enterócitos do intestino delgado, mas destrói a arquitetura microvilar normal, induzindo a lesão característica e a lesão effacing. Os distúrbios do citoesqueleto são acompanhados por uma resposta inflamatória e diarreia. **1.** Adesão inicial, **2.** Translocação de proteínas por secreção do tipo III, **3.** Formação do pedestal. **b** | EHEC também induz a adesão *attaching-effacing*, mas no cólon. A característica distintiva da EHEC é a elaboração da toxina Shiga (Stx), cuja absorção sistêmica leva a complicações potencialmente fatais. **c** | Da mesma forma, a ETEC adere aos enterócitos do intestino delgado e induz diarreia aquosa pela secreção de enterotoxinas termolábeis (LT) e / ou termoestáveis (ST). **d** | EAEC adere ao epitélio do intestino delgado em um biofilme espesso e produz enterotoxinas secretoras e citotoxinas. **e** | EIEC invade o epitélio celular do Cólon e lisa o fagossoma, movendo-se através da célula por nucleação de microfilamentos de actina. A bactéria pode se mover lateralmente através do epitélio por propagação direta de célula para célula, ou pode sair e voltar a entrar na membrana plasmática basal-lateral. **f** | DAEC provoca um efeito de transdução de sinal característico em enterócitos do intestino delgado, que se manifesta com o crescimento de projeções celulares de dedos longos, que envolvem as bactérias. AAF, fimbria de adesão agregada; BFP, pilus formador de feixe; CFA, antígeno de fator de colonização; DAF, fator de aceleração da decomposição; EAST1, proteína enteroagregativa ST1 de *E. coli*; LT, enterotoxina termo-lábil; ShET1, enterotoxina *Shigella* 1; ST, enterotoxina termoestável.

Fonte: Nataro, Kaper e Mobley, 2004.

Devido *E. coli* ser um microrganismo pertencente à microbiota intestinal (NATARO e KAPER, 1998), ao tornar-se um agente infeccioso com potencial para causar sinais clínicos como diarreia persistente, faz-se necessário como diagnóstico, a cultura bacteriana em meios seletivos para a correta identificação (LEVINE, 1987).

É por este motivo que a identificação de cepas de *E. coli* diarreiogênicas precisam ser diferenciadas de *E. coli* não patogênicas, pertencentes à microbiota intestinal (NATARO e KAPER, 1998). Uma vez que a colonização por *E. coli* é estabelecida, suas estratégias de permanência no epitélio são variadas, sendo elas: a produção de enterotoxinas, a invasão à célula hospedeira e adesão íntima à membrana celular. Para cada interação, um patotipo está envolvido, tendo um ou mais fatores de virulência associados. De acordo com Nataro e Kaper (1998), os seis patotipos de DEC possuem ao menos um fator de virulência relacionado a um gene cromossomal ou plasmidial, que determinam por sua vez, sua classificação (EAEC, ETEC, EPEC, EIEC, STEC).

2.2.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC), é um dos patotipos causadores de diarreia em humanos e animais. Segundo Beraldo (2015), amostras de EPEC patogênicas para humanos e animais possuem características genéticas em comum, de forma que os animais podem atuar como reservatórios, conferindo caráter zoonótico à doença.

A primeira descrição de EPEC foi em 1945, no Reino Unido por John Bray. Este pesquisador conseguiu identificar grupos de *E. coli* distintos sorologicamente (BRAY, 1945). Estes grupos foram isolados de crianças com diarreia e sem diarreia, contudo, crianças saudáveis não apresentaram os sorogrupos estudados na época (CRAVIOTO et al., 1979; LEVINE e EDELMAN, 1984). A partir desta data, com o aparecimento de novos surtos de diarreia e o aumento nas taxas de mortalidade, o termo EPEC surgiu definindo cepas de *E. coli* que estavam diretamente relacionada aos casos estudados.

Na atualidade, surtos de EPEC são menos comuns em países desenvolvidos, todavia ainda oferecem riscos à saúde humana e animal, representando um importante agente diarreiogênico em diversos países (CONTRERAS e OCHOA, 2011; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

Dentro dos patótipos de *E. coli*, existem grupos clonais caracterizados de acordo com os antígenos O e H em comum, que os definem em sorogrupos (antígeno O) ou sorotipos (antígeno O e H) (BERALDO, 2015; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

Os principais sorogrupos de EPEC descritos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são: O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158. Os diferentes aspectos genotípicos e fenotípicos de EPEC foram descritos por Trabulsi, Keller e Tardelli Gomes (2002), e mostram-nos que existem grupos constituídos por diferentes sorotipos.

A capacidade de EPEC causar quadros graves de diarreia, principalmente em crianças em países em desenvolvimento, deve-se especialmente pela capacidade de realizar lesão do tipo “Attaching and Effacing” (A/E). O objetivo da bactéria ao utilizar este mecanismo é causar destruição da microvilosidade do epitélio, garantir aderência e formar um pedestal de actina junto de outros elementos do citoesqueleto celular do hospedeiro (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). Através deste pedestal formado, o epitélio intestinal perde sua capacidade absorptiva, o que resulta no quadro de diarreia (FAIRBROTHER, NADEAU e GYLES, 2005).

A formação do pedestal pela lesão A/E precisa que diversos genes sejam expressos. Segundo McDaniel e colaboradores (1995), estes genes estão localizados em Ilhas de Patogenicidade (PAI) de 35kb, denominadas “*Locus of Enterocyte Effacement*” (LEE). Esta região é composta pelos genes *eae* e *tir* (*Translocated Intimin Receptor*), que codificam nesta ordem, uma proteína de membrana externa (Intimina) e um receptor (Tir), que pode ser deslocado para a célula epitelial (KENNY et al., 1997). O gene *eae*, codifica uma proteína denominada Intimina, necessária para que a bactéria consiga atacar a mucosa intestinal e se fixar ao epitélio.

Junto destes fatores, EPEC pode expressar um fator de aderência conhecido como “*Bundle-Forming Pil*” (BFP), uma proteína codificada pelo gene *bfp*, localizado em um plasmídeo denominado EAF, que também carrega outros genes importantes para adesão bacteriana (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; NATARO e KAPER, 1998).

Em 1995, as EPEC foram subdivididas em EPEC típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). As primeiras apresentam o gene *eae* e o plasmídeo EAF contendo o gene *bfp*, já as segundas sugere-se que o plasmídeo EAF tenha sido perdido. Há também

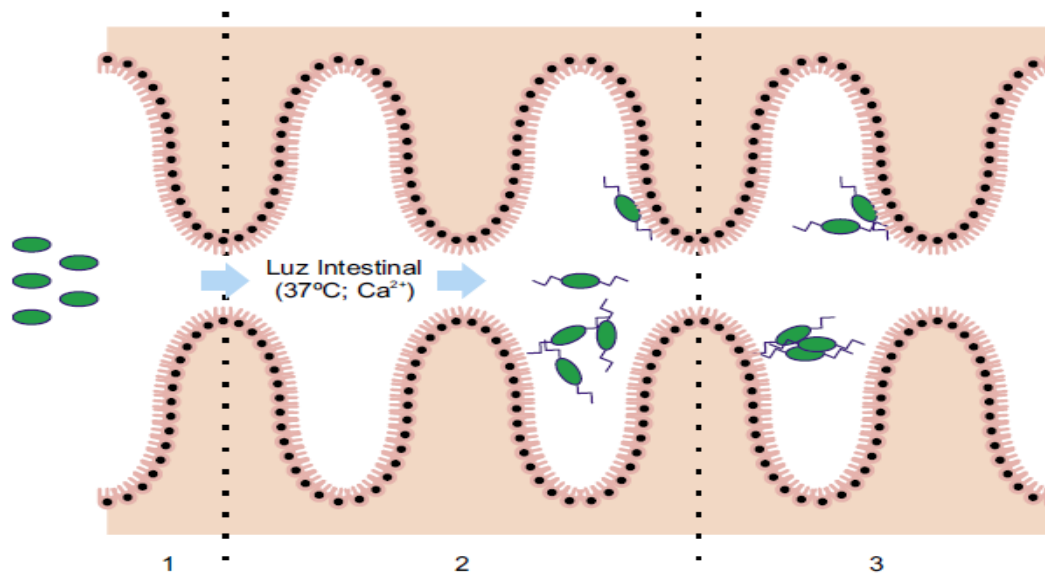
a caracterização junto de padrões de adesão conhecidos como Adesão Localizada (AL), Adesão Agregativa (AA) e Adesão Localizada-Like (ALL) (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; SCALETSKY, SILVA, TRABULSI, 1984; TRABULSI, KELLER, TARDELLI GOMES, 2002).

Sabe-se que a fímbria BFP está definitivamente envolvida com aderência entre bactérias no processo de adesão, sendo necessário no primeiro estágio da infecção, levando formação de ligações que resultam na adesão localizada (CLEARY et al., 2004; CHEN e FRANKEL, 2005). Além do BFP, outras adesinas auxiliam e participam da colonização da superfície da mucosa, contudo, o BFP é necessário para formar o complexo de bactérias no local da adesão. Isto nos mostra a redundância na expressão de fatores de colonização realizada por EPEC, e que as diferenças nos ensaios experimentais de diferentes autores podem favorecer um mecanismo ou outro (CHEN e FRANKEL, 2005).

De acordo com Johnson e Nolan (2009), ainda não é possível afirmar que cepas de EPEC típicas são mais virulentas que cepas de EPEC atípicas, ou se ambas possuem fatores de virulência alternativos na ausência do plasmídeo EAF. Estudos feitos por Knutton e colaboradores (1999) e Silva e Dias (2006), mostraram que o contato inicial entre cepas de EPEC e a célula alvo no hospedeiro com formação de adesão localizada (AL) tendem a seguir o padrão de lesão celular A/E, formando colônias de bactérias que em seguida à lesão, se dispersam (**figura 2**). Muitos autores consideram como uma das principais características de virulência deste patotipo, a adesão íntima à superfície das células epiteliais, com destruição das microvilosidades em seguida, formação de pedestal e agregação bacteriana. Porém, isto não está restrito a cepas de EPEC, podendo ser encontradas características similares a estas em cepas produtoras de Shiga-toxina (NATARO e KAPER, 1998; KNUTTON et al., 1999).

Ainda que mais estudos sejam necessários, EPEC é um dos patotipos que mais se tem conhecimento dentro do estudo de DEC. Desde sua descoberta em 1945, os mecanismos de adesão e colonização e seus fatores de virulência, são estudados até hoje por diversos autores (BRAY, 1945; CHEN e FRANKEL, 2005).

Figura 2 - Estágio inicial da infecção por EPEC



EPEC na luz intestinal (fase 1) por influência de condições locais, 37° C e Ca⁺⁺, por exemplo, aciona genes *bfpA* do plasmídio a produzir BfpA componentes que formam feixes (fase 2) para adesão inicial da bactéria aos enterócitos e de agregação entre as bactérias do grumo aderido (fase 3).

Fonte: Azevedo Silva, Juliana & Dias da Silva, Wilmar (2007).

Na suinocultura, EPEC foi descrita recentemente por Kataria e colaboradores (2017) na Índia, onde estudos avaliaram a presença de cepas de DEC em leitões com o objetivo de identificar patotipos presentes nos animais do local onde a pesquisa foi realizada. Este estudo aponta a importância dos suínos como reservatórios de cepas patogênicas de EPEC para a população que mantém contato com estes animais, independente do sistema de criação utilizado.

Cepas de EPEC ainda são alvos de pesquisas em animais domésticos como cães, gatos, bovinos e ovinos, por exemplo, (MARTINS, 2013; MORATO et al., 2009; NAKAZATO et al., 2004 PUÑO-SARMIENTO, 2013). No entanto, ainda são necessários mais estudos que relacionem suínos em sistemas de produção como reservatórios de DEC.

2.2.2 *Escherichia coli* Produtora de toxina Shiga (STEC/EHEC)

STEC é um patotipo de DEC responsável por enterites e quadros de colites hemorrágicas e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos, e doença do edema em suínos. Seu principal reservatório são os bovinos, e sua transmissão

pode ocorrer através da ingestão de alimentos contaminados com este patotipo (BRYAN et al., 2015). Seu sorotipo mais comum é o O157:H7, responsável por diversos surtos de SHU pelo mundo desde 1982, contudo, em 2011 o sorotipo O104:H4 também foi responsável por 54 mortes por SHU na Alemanha (RILEY et al., 1983; FRANK, WERBER, CRAMER, 2011).

Este patotipo muitas vezes é classificado como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) devido a produção de toxinas Shiga (Stx) que levam aos quadros hemolíticos, no entanto, segundo Bryan e colaboradores (2015) este termo deveria ser evitado, considerando que Stx1 e Stx2 são toxinas que podem ser produzidas por outros patotipos de DEC já descritos na literatura, como em EAEC por exemplo (MORABITO et al., 1998). Dentro deste patotipo, existe um subtipo conhecido como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), que apresenta características genéticas de grande importância como o Operon LEE ("*Locus of Enterocyte Effacement*"), responsável por participar da lesão A/E que aumenta a gravidade da infecção (AE et al., 1992; YU e KAPER, 1992).

O sorotipo O157:H7 é um patotipo de EHEC responsável por diversos surtos de diarreia sanguinolenta em humanos (CDC, 2017), e a infecção por EHEC inicialmente aparenta ser assintomática, seguindo para colite hemorrágica, com grande potencial para atingir um quadro de SHU (TARR; GORDON; CHANDLER, 2005). A transmissão de cepas de EHEC ocorre de forma esporádica, em surtos, pela via fecal-oral e mais frequentemente, pela ingestão de carne crua contaminada (CRUMP et al., 2002). De acordo com estudos realizados por García, Fox e Bresser (2010), os reservatórios de EHEC O157:H7 incluem animais domésticos, principalmente bovinos. Apesar de diferentes espécies de animais atuarem como reservatório, todo o mecanismo da doença causada por EHEC sugere o envolvimento de fatores não só do hospedeiro, mas também ambientais e de manejo, que influenciam e desencadeiam o quadro enterohemorrágico (GARCÍA; FOX; BESSER, 2010).

O patotipo STEC pode produzir dois tipos distintos de toxinas, Stx1 e Stx2, isoladas ou em combinação. A toxina Stx tem capacidade de inibir a síntese proteica da célula eucariótica (OGASAWARA et al., 1988; PATON e PATON, 1998).

Os genes que codificam Stx (*stx*) são encontrados em bacteriófagos e podem apresentar variações (FRIEDRICH et al., 2002). Os danos causados ao endotélio devido a ação de Stx ativam a coagulação, inibem a lise de fibrina e levam ao seu

acúmulo, que aumentam as chances de formar trombos (TARR; GORDON; CHANDLER, 2005).

Stx foi inicialmente descrita em cepas de *Shigella dysenteriae* e em alguns sorogrupos de *E. coli* que as produzem. Algumas cepas de *E. coli* produzem ainda o tipo Stx2, que possui a mesma função de Stx1, contudo com características antigênicas distintas. De maneira geral, Stx leva ao acúmulo de fluidos em alças intestinais, podendo causar diarreia sanguinolenta e até a Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU), que pode acarretar injúrias graves aos rins e ao endotélio vascular (MELTON-CELSA, 2014). Sabe-se que Stx liga-se aos receptores de globotriaosilceramida (Gb3) expressos por células da cripta do epitélio intestinal e atua a partir desta ligação. Após ligar-se ao receptor Gb3, Stx é endocitada e transportada até o complexo de Golgi, e em seguida, ao retículo endoplasmático. A subunidade A é translocada para o citoplasma onde age nos ribossomos, atuando na síntese proteica. Todo este mecanismo resulta na interrupção da síntese de proteínas das células que apresentam receptores Gb3, levando estas a morte.

A família de toxinas Stx possui unidades conservadas AB em sua estrutura, composta por uma unidade A considerada ativa, ligada a uma subunidade B pentamérica responsável pela ligação da toxina a glicolipídeos específicos na superfície da célula alvo (GOMES et al., 2016). Dentro desta família de toxinas, encontramos os grupos de toxinas Stx1 e Stx2, onde cada uma deles possui variações em sua composição de sequências de aminoácidos. Em Stx1 há maior homogeneidade, e as variações limitam-se atualmente às toxinas Stx1a, Stx1c e Stx1d - sendo Stx1d provenientes de amostras bovinas (BÜRCK et al., 2003). Enquanto que em Stx2, a variação é maior assim como a heterogeneidade presente nos subtipos desta toxina, representada pelos grupos compostos por Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g (SCHEUTZ et al., 2012). Das toxinas STx2 descritas acima, a mais importante delas na suinocultura hoje em dia é Stx2e, por estar diretamente associada à doença do edema (MOXLEY, 2000).

A principal diferença entre Stx1 e Stx2 encontra-se na neutralização por anti-soro da citotoxina de *S. dysenteriae* 1, onde o grupo Stx2 é neutralizado por anti-Stx2 somente (O'BRIEN; HOLMES, 1987). Além disso, Head e colaboradores (1991), descreveu a afinidade de Stx1 a receptores Gb3 como dez vezes maior quando comparado a Stx2.

No entanto, estudos mais recentes mostraram que uma vez ligada ao receptor, Stx2 tem uma velocidade de dissociação do receptor, menor que Stx1, o que nos mostra que tanto a ligação quanto a dissociação, ocorrem com menor velocidade. Isto pode justificar uma relação maior entre Stx2 e danos vasculares na SHU, comparados a Stx1 (NAKAJIMA et al., 2001).

Suíños não são considerados a fonte principal de STEC, devido à prevalência deste patotipo não ser tão alta de forma geral. Contudo, amostras positivas para STEC têm sido isoladas desta espécie e de produtos de origem suína envolvendo infecções humanas (BOUVET et al., 2002). A capacidade do sorotipo O157:H7 ser encontrado em suínos foi avaliada através de inoculação experimental de amostras de STEC, em 2002, por Booher, Cornick e Moon. Uma dose de 10^7 UFC/animal somada a uma dose de EPEC e ETEC a 10^{10} UFC foi inoculada em suínos, e nas amostras fecais destes animais, foram isoladas cepas de STEC até dois meses após a inoculação. Este patotipo manteve-se em alta concentração na microbiota intestinal dos animais comparada aos outros patotipos utilizados. A importância deste estudo mostra novamente, a grande capacidade de suínos serem portadores e reservatórios de cepas de STEC de potencial zoonótico. Outro estudo feito na África do Sul, detectou o sorotipo O157:H7 em 43 animais de um total de 500, revelando que, no local onde o estudo foi realizado, 8,6% dos suínos submetidos ao experimento mostraram ser portadores de EHEC (IWU et al., 2016).

Ainda são necessários mais estudos relacionando suínos à STEC e EHEC, contudo, podemos observar que um dos sorotipos de maior destaque na saúde humana (O157:H7) já pode ser encontrado não só em bovinos, mas também em suínos, como mais uma fonte importante deste microrganismo patogênico.

2.2.3 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

E. coli Enteroagregativa (EAEC) é considerado um enteropatógeno emergente, principalmente em países em desenvolvimento (REGUA-MANGIA et al., 2009). EAEC foi descrita inicialmente na década de 80, em um estudo de surto de diarreia em crianças (NATARO et al., 1987). Ao estudar cepas originadas de amostras dos casos de diarreia infantil no Chile, Nataro e colaboradores (1987) observaram e determinaram que a presença de adesão difusa, apresentada pelas cepas de *E. coli* poderia se dividir em mais dois tipos de adesão, a adesão agregativa típica e a

adesão difusa (AD). A diferença entre as duas categorias mostrou-se na maneira em que as bactérias se aglutinavam umas às outras em testes de adesão.

Na categoria AA, as bactérias formavam um agregado organizado, com configuração semelhante à uma “empilhado de tijolos”; na adesão difusa, as bactérias apenas se aglutinavam, porém sem organização específica ao redor da célula. A partir destes termos, cepas de EAEC produtoras de adesão AD passaram também a ser conhecidas como DAEC (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

A capacidade de EAEC aderir de forma organizada deve-se à presença de adesinas de origem fimbriais, das quais podemos destacar as Fímbrias de Adesão Agregativa (FAA), onde incluem-se variações como AAF/I, II, III e IV, com suas estruturas de subunidades (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC; 2002; LIMA et al., 2013; NATARO et al., 1992).

Em sua maioria, cepas de EAEC colonizam o epitélio intestinal de forma agregativa devido à presença de fímbrias de adesão agregativa (FAA), das quais destacam-se quatro variantes antigênicas (BOISEN et al., 2012). As FAA são reguladas por um gene ativador transcricional – *AggR* (BOISEN et al., 2012; JENKINS et al., 2005), que por sua vez é necessário para codificar outros genes, o *aap*, *Aat*, e o grupo *Aai*, que codifica um sistema de secreção tipo IV (BOISEN et al., 2012; DUDLEY et al., 2006).

Nataro, Steiner e Guerrant (1998) mostraram que o gene *AggR* promove a expressão de fatores de virulência, e determina que as cepas de EAEC sejam descritas como típicas ou atípicas, quando o apresentam. Segundo estes autores, a adesão AA em células HEp-2 ou HeLa pode ser utilizada como diagnóstico padrão para detecção de EAEC. Contudo, alternativas de metodologias para detectar este patótipo vêm sendo descritas por Lima e colaboradores (2013) e Andrade, Gomes e Elias (2014). Tais alternativas se baseiam na busca por fatores de virulência de origem plasmidial, através de métodos como PCR, o que segundo Cerna, Nataro e Estrada-García (2003), desfavorece a detecção de cepas atípicas de EAEC. Além da busca de genes plasmidiais, é possível realizar a busca de genes cromossômicos, descrita por Jenkins e colaboradores (2005) e Lima e colaboradores (2013), através de genes como *aaiC* e *aaiG* também descritos por Dudley e colaboradores (2006).

A primeira toxina descrita em EAEC foi EAST-1, uma toxina termoestável relacionada à toxina STa de *E. coli* Enterotoxigênica, que participa da resposta

secretora da célula intestinal, levando ao quadro de diarreia (SAVARINO et al., 1991).

A patogenia de EAEC descrita por Nataro e colaboradores (1998) sugere que esta ocorra em três estágios. O estágio I envolve a adesão inicial à mucosa intestinal; no estágio II, há um aumento na produção de muco, levando à deposição e biofilme já contendo EAEC, que promove a colonização e a má absorção de nutrientes pelo intestino; no estágio III, sugere-se existir a produção de citotoxinas que acarretam danos ao epitélio intestinal. Quando no hospedeiro, causando diarreia, EAEC aumenta a secreção de muco na camada mucosa do intestino, formando biofilme no local. A alta produção de muco como resposta inflamatória à presença de EAEC, deve-se por esta possuir transportadores de enzimas proteases como a serina, que atua sob células produtoras de muco, junto de sua capacidade de produzir biofilme. Todo este mecanismo favorece a permanência de bactérias aglutinadas na camada espessa de muco no epitélio intestinal (ELIAS; NAVARRO-GARCIA, 2016).

Atualmente a literatura traz algumas opções de protocolos de PCR para detecção simultânea de genes de DEC, contudo, para a detecção molecular de EAEC estão disponíveis apenas marcadores para um ou dois genes, como AAp, por exemplo, o que exclui a detecção de cepas atípicas de EAEC (PANCHALINGAM et al., 2012).

Segundo Regua-Mangia e colaboradores (2009), a resistência deste patotipo frente à antimicrobianos tem sido uma característica importante. Diversos estudos já relataram EAEC multiresistentes, incluindo cepas produtoras de Beta Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e resistentes à Quinolonas, isoladas de humanos (ASLANI et al., 2011; AMAYA et al., 2011; BANGAR; MAMATHA, 2008; GUIRAL et al., 2011).

A relação da espécie suína com EAEC se dá inicialmente através de leitões gnobióticos, em estudos específicos. Este modelo experimental é utilizado devido a grande semelhança de patogenia causada por EAEC em humanos (TZIPORI et al., 1992). São necessários mais estudos para determinar a presença de EAEC como patógeno responsável por quadros de enterites em suínos na cadeia produtiva.

2.2.4 Escherichia coli Enterotoxigênica (ETEC)

Descrita inicialmente em 1968 (BANWELL et al., 1971), ETEC é a segunda maior classe de *E. coli* diarreiogênica a ser associada à quadros de diarreia em humanos na década de 60 (LEVINE, 1987). Este patotipo está relacionado frequentemente à diarreia infantil em países em desenvolvimento (QADRI et al., 2005). Nestes países é possível isolar cepas tanto de pacientes sintomáticos, quanto assintomáticos, em sua maioria, crianças (QADRI et al., 2005). Sua principal característica envolve a capacidade de produzir enterotoxinas Termoestáveis (ST) e Termolábeis (LT), além de carregar diversos fatores de colonização (CFs) importantes para a aderência ao epitélio intestinal (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016). Os CFs foram descritos como os primeiros fatores de virulência de ETEC, e desde então são utilizados como base para vacinas de uso animal contra este patotipo (WALKER; STEELE; AGUADO, 2007).

Estudos realizados com base em populações que já entraram em contato com ETEC demonstraram que crianças em países em desenvolvimento são as mais afetadas, na faixa etária de 0 a 4 anos de idade (WENNERAS; ERLING, 2004). Grande parte da morbidade e mortalidade associada à ETEC responsável por quadros graves de diarreia infantil em países em desenvolvimento, envolve também a produção de toxinas ST a partir deste patotipo (QADRI et al., 2007; STEINSLAND et al., 2002; VIBOUD et al., 1999;).

Os sinais clínicos causados por ETEC são clássicos, como diarreia aquosa, devido à colonização que ocorre na mucosa epitelial do intestino delgado, onde o microrganismo é capaz de produzir enterotoxinas que levam ao aumento da secreção intestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Em animais de produção, ETEC causa quadros de diarreia importantes, devido à expressão de fímbrias que permitem sua colonização, como as fímbrias K88 e K99. Os receptores para estas fímbrias são encontrados principalmente em suínos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As toxinas ST e LT podem ser expressas somente uma por vez, ou ambas ao mesmo tempo pela mesma ETEC. As estruturas destas toxinas são muito semelhantes às produzidas pelo *Vibrio cholerae*, a toxina CT, que possui uma subunidade A responsável pelo papel de toxicidade, e uma unidade pentamérica B (SPANGLER, 1992). Quando ativa, a subunidade B faz com que os canais de cloro

das células intestinais fiquem abertos por mais tempo, causando então a diarreia aquosa (SEARS; KAPER, 1996). Na década de 50, De, Bhattacharya e Sarkar (1956) observaram que algumas cepas de *E. coli* eram responsáveis por quadros de diarreias em humanos, muito similares à Cólera. Apesar da maioria das cepas de *E. coli* não possuir genes que codificam toxinas, algumas cepas são capazes de secretar toxinas termolábeis, homólogas às toxinas CT.

A toxina ST divide-se em STa e STb, diferindo uma da outras pelo mecanismo de ação. Sua produção depende de genes plasmidiais (HARNETT; GYLES, 1985). STa assemelha-se ao hormônio Guanilina, encontrado no intestino, e quando ativo, este hormônio liga-se a receptores Guanilato ciclase (GC-c), levando ao aumento de GMP cíclico intracelular, que resulta na desregulação da absorção e secreção de íons na célula intestinal. O resultado deste mecanismo é o quadro de diarreia aquosa, que pode levar à desidratação em pouco tempo (SEARS; KAPER, 1996).

STb já foi descrita em ETEC de origem humana, no entanto, está associada principalmente aos suínos, onde para a espécie, apresenta relação com quadros de diarreia em leitões desmamados (SPITZER et al., 2014; ZHANG et al., 2006). Ao contrário de STa, STb apresenta ação rápida, contudo, com potência moderada em relação a outras enterotoxinas (DUBREUIL et al., 2008).

A toxina LT faz parte de um grupo importante de toxinas entéricas, e possui os subtipos LT-I e LT-II (DUBREUIL et al., 2016). LT-I é comumente isolada de quadros de enterite em humanos, enquanto LT-II, de animais domésticos. Ambas são transportadas através da membrana celular externa pelo sistema de secreção tipo II (TAUSCJEK et al., 2002). Toxinas LT também pertencem ao grupo AB, onde existe uma subunidade A e uma subunidade pentamérica B. A toxina LT liga-se à membrana celular através dos Lipopolissacarídeos (LPS) e então é internalizada pela célula hospedeira através da subunidade B, por endocitose. Estas reações levam ao aumento de AMP cíclico, que resulta em estímulos à secreção de Cloreto e outros eletrólitos importantes para a célula (SPANGLER, 1992). Além disso, LT pode estimular o sistema nervoso entérico, através da ativação de prostaglandinas, que levam ao aumento da secreção e conseqüentemente, inibem a absorção de fluidos, piorando o quadro clínico.

O impacto causado por ETEC em humanos é tão importante quanto na indústria suinícola, onde o aparecimento frequente de diarreia neonatal e pós desmame em leitões causado por este patotipo, leva a perdas econômicas

importantes (NATARO; KAPER, 1998). Em animais de produção como suínos, por exemplo, ETEC é a causa mais comum de diarreia devido sua produção de toxinas e adesinas receptoras específicas para enterócitos. As adesinas são expressas como fímbrias do tipo F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17 e F18 (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016).

De acordo com Van Beers-Schreurs e colaboradores (1992) e Fairbrother, Nadeau e Gyles (2005), a presença de ETEC no meio ambiente onde existam suínos, por exemplo, é um importante fator de transmissão destes patógenos, devido à capacidade da bactéria sobreviver em torno de um período de seis meses. Estes microrganismos passam do meio ambiente para o hospedeiro pela via oral. Em humanos, a dose de ETEC necessária para causar doença seria de 3×10^8 a 3×10^{10} UFC, contudo, uma dose menor – não especificada pelo autor - em animais, é considerada suficiente para o aparecimento de sintomas (TACKET et al., 1994).

Para produtores, enterites bacterianas são um dos maiores desafios nas fases neonatal e pós desmame em leitões, pois a transmissão do agente infeccioso pode ocorrer a partir de animais assintomáticos, ou mesmo desde as matrizes com ou sem sinais clínicos (GYLES et al., 2010). O resultado destes quadros entéricos resulta em perdas econômicas e gastos com tratamentos.

A infecção nos leitões pode ocorrer com poucos dias de vida, devido algumas condições como o pH estomacal e duodenal serem mais alcalinos ou mesmo a produção de enzimas digestivas ser insuficiente. Em leitões neonatos, ETEC é descrita como o agente primário, causador de diarreia dentre os três a cinco primeiros dias de vida (FAIRBROTHER; NADEAU, GYLES, 2005). Os sinais clínicos na diarreia pós desmame aparecem entre três a dez dias após o desmame, o que também é considerado um fator que desencadeia estresse nos animais, resultando em queda na imunidade que aumenta as chances de enterites acontecerem (DUBREUIL, 2016).

A colonização de patógenos de origem bacteriana mediada por fímbrias foi primeiro demonstrada em suínos antes de estudos serem realizados em outros mamíferos ou humanos. Com isso, o primeiro antígeno de adesão descrito em cepas de *E. coli* foi o antígeno F4, inicialmente nomeado K88, por ser um antígeno capsular (ORSKOV et al., 1961). A comprovação de sua origem plasmidial foi mostrada mais tarde, na década de 60 (STIRM; ØRSKOV; ØRSKOV, 1966).

EPEC também é considerada causa principal de diarreia neonatal em bezerros e cordeiros nos primeiros quatro dias de vida, bem como em cães, porém nesta espécie ainda são necessários estudos que caracterizem fimbrias específicas (DROLET et al., 1994; HAMMERMUELLER et al., 1995; FOSTER ; SMITH, 2009).

2.2.5 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

O grupo de *E. coli* capaz de invadir células do epitélio intestinal denomina-se EIEC. Este grupo está envolvido em doenças intestinais similares às causadas pela *Shigella* spp. devido sua capacidade enteroinvasiva. Sua transmissão ocorre pela ingestão de alimentos contaminados ou contato pessoal (GORDILLO, 1992). A primeira descrição de EIEC aconteceu em 1947 (EWING; GRAVATTI, 1947), e a diferença entre outras cepas de *E. coli* e sua semelhança com o gênero *Shigella* foi observada pela presença e antígenos somáticos e pela ausência de motilidade em sua maioria, não produção de gás e não descarboxilação da Lisina (SILVA; TOLEDO; TRABULSI, 1980).

EIEC está associada a quadros de colite inflamatória invasiva, podendo ocorrer concomitantemente disenteria na maioria dos casos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O mecanismo de invasão de EIEC tem como característica a evasão da resposta imune do hospedeiro, desta maneira, a bactéria consegue penetrar nas células epiteliais do cólon através de adesinas e mover-se lateralmente pelas células adjacentes, invadindo-as e causando infecção (SCHROEDER; HILBI, 2008). Este mecanismo de invasão acaba por destruir as células do epitélio intestinal, e a especificidade deste patotipo por células da mucosa do intestino grosso, fazem com que haja inibição ou indução de vias de sinalização celular no epitélio, resultando em inflamação (LEVINE, 1987).

Segundo Sansonetti, Kopeck e Formal (1982), a patogenicidade das EIEC depende da expressão de genes contidos em plasmídeos semelhantes ao encontrado em *Shigella* spp.. Nestes plasmídeos, estão localizados genes que codificam o sistema de secreção tipo III, capaz de carregar diversos fatores de patogenicidade tais como proteínas IpaA, IpaB, IpaC, IpaD e ipaH, responsáveis por sinalizar células epiteliais, rearranjar o citoesqueleto, invadir a célula e lisar vacúolos endocíticos (CLEMENTS et al., 2012).

Tanto em humanos quanto em animais domésticos como suínos, surtos relacionados a cepas de EIEC são menos comuns quando comparados a outros patótipos de DEC. O maior surto de EIEC relatado data de 1973 nos Estados Unidos, devido o consumo de queijo contaminado importado da França. Ainda em humanos, outro surto de EIEC aconteceu no Japão, com 670 casos, onde os sintomas apresentados eram febre alta e diarreia aquosa, característicos de EIEC (MENG et al., 2001). Um novo estudo feito em 2013 por Lozer e colaboradores, observou a presença de cepas de EIEC em 141 crianças com e sem diarreia. Deste total, foram isoladas 560 amostras fecais, onde obtiveram 1943 amostras de *E. coli*. Apenas 0,5% das amostras eram positivas para EIEC, enquanto outros patótipos de DEC apresentaram maior incidência (EAEC, 20,9%; DAEC, 11,6%; EPEC, 9,3%).

Em veterinária, com ênfase na área de produção e animais domésticos, EIEC ainda carece de mais estudos.

2.3 Resistência de *E. coli* a antimicrobianos na suinocultura

Devido sua alta capacidade de disseminação de resistência, *E. coli* mostra-se um desafio na suinocultura frente ao tratamento com antimicrobianos. A transferência horizontal de genes de resistência a outras bactérias, somada ao uso de antimicrobianos em subdoses por curtos períodos de tempo, e também nas rações dos animais, acarreta no aumento na diversidade de cepas multirresistentes e riscos à saúde pública (COSTA et al., 2010; LOOFT et al., 2012).

A multirresistência já foi citada por diversos autores, apresentando níveis mais altos de resistência na espécie suína e em aves, quando comparadas a espécie bovina, por exemplo (BACCARO et al., 2002, GUERRA et al., 2003). Esta situação deve-se principalmente pelo uso intenso de antimicrobianos na ração animal e em tratamentos (GUERRA et al., 2003).

O uso dos antimicrobianos e a difusão de patógenos resistentes estão cada vez mais comuns tanto em humanos quanto em animais domésticos. Segundo Looft e colaboradores (2012), estudos mostraram que existe um aumento de genes funcionais na microbiota de suínos, que auxiliam na produção de energia e conversão alimentar, quando estes são alimentados com rações suplementadas com antimicrobianos. Na Europa, desde 2006, o uso de antimicrobianos promotores de crescimento está banido das dietas de suínos (GAGGIA et al., 2010).

Contudo, no Brasil, os modelos de sistema de produção utilizadas são muito variados, geralmente apresentando alta densidade animal, mistura de linhagens de leitões de matrizes diferentes, dentre outros fatores de risco aos rebanhos. Todos estes fatores criam condições adequadas para o aparecimento de doenças, sendo esta a justificativa dos produtores para usar drogas antimicrobianas em doses subterapêuticas, de forma preventiva ou para promover o crescimento dos animais (MORÉS et al., 2012; MORÉS, 2014). Além destes fatores, outro fator de grande importância é a prática do desmame precoce, com animais com idade inferior a 23 dias. Esta idade ainda tem grande influencia na integridade microbiota intestinal, especialmente na barreira da mucosa, onde a maioria dos patógenos como DEC, por exemplo, se instalam e causam infecção (SMITH et al., 2010).

Não existem relatos recentes sobre os mecanismos de transferência de genes de resistência em cepas de *E. coli* isoladas de suínos. Entretanto, dentre os mecanismos de aquisição de resistência, os principais utilizados por cepas de *E. coli* são a transposição e integração de genes (SHERLEY, 2004).

Um estudo realizado na França com suínos, em 2017, demonstrou a presença de diversos perfis de resistência em cepas de *E. coli* diarreiogênicas, enfatizando que metade dos isolados eram resistentes à Sulfonamidas, Trimetropim, Tetraciclina, Ampicilina ou Cloranfenicol, além de detectarem através de PCR, o gene que confere resistência à Colistina, *mcr-1* (DELANNOY et al., 2017).

E. coli encontra-se entre as espécies consideradas com maior incidência de multirresistência a antimicrobianos (SHERLEY et al., 2004). Em 2005, Boerlin et al. observaram uma grande diferença na resistência de isolados de ETEC e de outros microrganismos. Isto também aconteceu com cepas de STEC, resistentes a mais de uma classe de antimicrobianos que eram utilizados na alimentação de suínos na Suíça (STEPHAN; SCHUMACHER, 2001).

O impacto da utilização de antimicrobianos na produção animal é um assunto amplamente debatido na atualidade (MORÉS, 2014). Contudo, para os produtores, esta é a alternativa com melhor custo benefício, que mantém bons índices de produção e melhora a eficiência nutricional.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Relatório Anual da ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, p. 134, 2017.
- AE, J. et al. A Genetic Locus of Enteropathogenic *Escherichia coli* Necessary for the Production of Attaching and Effacing Lesions on Tissue Culture Cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 214, 1992.
- AMAYA, E. et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 216–222, 2011.
- ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteraggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 16-18, nov. 2014.
- ASLANI, M. M. et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, 2011.
- BACCARO, M.R. et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, 2002
- BANGAR, R.; MAMATHA, B. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian journal of medical sciences**, v. 62, p. 8–12, 2008.
- BANWELL, J. G. et al. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. II. Alterations in intestinal fluid and electrolyte movements. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 4, p. 890–900, 1971.
- BARCELLOS D. & OLIVEIRA S.J. Doenças relacionadas ao efeito do gene de estresse suínos (*RyR1*), p.752-756. In: Sobestiansky J. & Barcellos D. (Eds), **Doenças dos Suínos. 2ª ed.** Cãnone Editorial, Goiânia. 2012.
- BERALDO, L. G., Análise molecular de estirpes de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de animais e humanos – **Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, p. 63, 2015
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 2002.

- BOERLIN, P. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6753–6761, 2005.
- BOISEN N., SCHEUTZ F., RASKO D.A. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J Infect Dis**;205:431–444, 2012
- BOOHER, S. L.; CORNICK, N. A.; MOON, H. W. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 69–81, 2002.
- BOUVET J, BAVAI C, ROSSEL R, LE ROUX A, MONTET MP, RAY-GUENIOT S, MAZUY C, ATRACHE V, VERNOZY-ROZAND C., Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology** 77: 91-97. 2002
- BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 239–247, mar. 1945.
- BRUM, Juliana S. et al . Características e frequência das doenças de suínos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro , v. 33, n. 10, p. 1208-1214, Oct. 2013 .
- BRYAN, A.; YOUNGSTER, I.; MCADAM, A. J. **Shiga Toxin Producing *Escherichia coli***/Clinics in Laboratory Medicine, 2015.
- BURK, C. et al. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT : H19 of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2106–2112, 2003.
- CDC - Centers For Disease Control And Prevention. **E. coli homepage**. Acesso em: novembro, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
- CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, v. 1, p. 83-98, jan. 2005.
- CLEARY, J., et al. Enteropathogenic *Escherichia coli*(EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: Role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527–538, 2004.
- CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v.3, p. 71-78, 2012.
- CONTRERAS, C. A., OCHOA, T. J. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion Infectious Disease**, v. ; 24(5):, n. 10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b, p. pages 478–483., 2011.

- COOPER, V.L. Diagnosis of neonatal pig diarrhea. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.16, n.1, p.117-133, 2000.
- COSTA, A. R. F. et al . Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos. **Revista Pan-Amaz Saude, Ananindeua** , v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010 .
- CRAVIOTO, A., GROSS, R. J., SCOTLAND, S.M. and ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**. 3, 95-99. 1979
- CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* **Clinical Microbiology Reviews**, 2013.
- CRUMP, J. A. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. **The New England Journal of medicine**, v. 347, n. 8, p. 555–560, 2002.
- DE, S.N., BHATTACHARYA K., SARKAR J.K. A study of the pathogenicity of strains of Bacterium coli from acute and chronic enteritis. **Journal of Pathological Bacteriology** Jan;71(1):201-9. 1956
- DELANNOY, S. et al. Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, 2017.
- DROLET, R. et al. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Canadian journal of veterinary research- Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 58, n. 2, p. 87–92, 1994.
- DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, 2016.
- DUBREUIL, J.D., ISAACSON R.E., SCHIFFERLI D.M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**. 7(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0006, 2016.
- DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267–1282, 2006.
- ELIAS, W. P.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). In: **Escherichia coli in the Americas**. [s.l: s.n.]. p. 27–57, 2016
- ESTRADA-GARCIA, T. et al. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, 2009.
- EWING, W. H.; GRAVATTI, J. L. *Shigella* types encountered in the mediterranean area. **Journal of Bacteriology**, v. 53, n.2, p. 191-195. 1947

- FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, É.; 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, n. 1, p. 17–39, 2005.
- FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 2, p. 555–569, 2006.
- FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves Veterinary Clinics of North America - **Food Animal Practice**, v. 25, p 13-26, 2009
- FRANK C, WERBER D, CRAMER JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **New England Journal of Medicine**. 365(19): 1771–80. 2011
- FRIEDRICH, A. W. et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 74–84, 2002.
- GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. **Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production** *International Journal of Food Microbiology*, 2010.
- GARCÍA, A.; FOX, J. G.; BESSER, T. E. Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health perspective. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 51, n. 3, p. 221–32, 2010.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.
- GORDILLO, M.E.; REEVE, G.R.; PAPPAS, J.; MATHEWSON, J.J.; DUPONT, H.L.; MURRAY, B.E. Molecular characterization of strains of Enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.4, 1992
- GUERRA, B. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1210–4, 2006.
- GUIRAL, E. et al. CTX-M-15-producing enteroaggregative *Escherichia coli* as cause of travelers' diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1950–1953, 2011.
- GYLES, C. L., PRESCOTT, J. F., SONGER J. G, et al., **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition**. [s.l: s.n.]. 2010.
- GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Ed.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames, Iowa: **Iowa State University Press**, p.193-214. 2004.

- HAMMERMUELLER, J. et al. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 4, p. 265–270, 1995.
- HARNETT, N. M.; GYLES, C. L. Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64 and 101. **Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de médecine comparée**, v. 49, n. 1, p. 79–87, 1985.
- HEAD, S. C.; KARMALI, M. A.; LINGWOOD, C. A. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits: Evidence for B subunit modulation of a subunit function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 6, p. 3617–3621, 1991.
- HENTON, M.M.; HUNTER, P. *E. coli* infections. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Ed.). **Infectious diseases of livestock**. Oxford University Press, p.1085-1099. 1994.
- IWU, C. J., IWERIEBOR, B. C., OBI, L. C., OKOH A. I., Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in two commercial swine farms in the Eastern Cape Province, South Africa. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p. 48–53, 2016.
- JACOBSON, M. et al. Diarrhoea in the growing pig - A comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 2, p. 163–169, 2003.
- JENKINS, C. et al. Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 119–124, 2005.
- JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750–774, 2009.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.
- KATARIA, JOY & DATTA, T.K. & ROYCHOUDHURY, P. Virulence gene(s) Gamut of Enteropathogenic *Escherichia coli*(EPEC) and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*(STEC) in Piglets with or without Diarrhoea in Mizoram (India). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 6. 1983-1987. 10.20546/ijcmas.611.235. 2017
- KENNY, B. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511–520, 1997.
- KICH, J. D. et al. Prevalence, distribution, and molecular characterization of Salmonella recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 307–313, 2011.

- KNUTTON, S. et al. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 499–509, 1999.
- LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic reviews**, v. 6, p. 31–51, 1984.
- LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 3, p. 377–381, 1987.
- LIMA, I. F. N. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART5, p. 683–693, 2013.
- LOOFT, T. et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 5, p. 1691–1696, 2012.
- LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 2013.
- MARTINS, F. H. Caracterização genotípica e fenotípica de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) isoladas de ovinos no norte do Estado do Paraná. 2013. 77 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina**. Londrina, 2013.
- MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1664–1668, 1995.
- MELTON-CELSA, A. R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, 2014.
- MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ed. Washington, APHA, p. 331-341. 2001
- MORABITO, S. et al. Enteroaggregative, shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 840–842, 1998.
- MORATO, E.P., LEOMIL, L., BEUTIN, L., KRAUSE, G., MOURA, R.A., PESTANA DE CASTRO, A.F., Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoonoses Public Health** 56, 229–237. 2009.

- MORÉS, N; MORÉS, M. A Z. Doença do Edema. In: SOBESTIANSKY, J. **Doenças dos suínos** / Editores: Jurij Sobestiansky, David Barcellos. Goiânia: Cãnone Editorial. p 141-145. 2007
- MORÉS, N.; BARCELLOS, D.E.S.N. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, p.116-122, 2012.
- MORÉS, N. É possível produzir suínos sem o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho? **VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal – Sala Suínos**. São Paulo- Brasil; Setembro, 2014
- MOXLEY RA. Edema disease. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**. 16:175–185. 2000
- NAKAJIMA, H. et al. Kinetic Analysis of Binding between Shiga Toxin and Receptor Glycolipid Gb3Cer by Surface Plasmon Resonance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 42915–42922, 2001.
- NAKAZATO, G., GYLES, C., ZIEBELL, K., KELLER, R., TRABULSI, L.R., GOMES, T.A., IRINO, K., DA SILVEIRA, W.D., PESTANA DE CASTRO, A.F., Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic E coli (EPEC). **Veterinary Microbiology**. 101, 269–277. 2004.
- NATARO J. P., KAPER J. B., ROBINS BROWNE R., PRADO V., VIAL P., LEVINE M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infectious Disease Journal**; 6:829-31. 1987
- NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2297–2304, 1992.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1 p. 142-201, jan. 1998.
- NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 4 N° 2, April-June 1998.
- O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, B. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. Washington, DC: ASM Press, p.2788-2802. 1986
- OGASAWARA, T. et al. Inhibition of protein synthesis by a Vero toxin (VT2 or Shiga-like toxin II) produced by *Escherichia coli* O157:H7 at the level of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes. **Microbial Pathogenesis**, v. 4, n. 2, p. 127–135, 1988.

- ORSKOV I, ORSKOV F, SOJKA WJ, LEACH J.M. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and Lantigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new *E. coli* K antigens: K 87 and K 88. **Acta Pathol Microbiol Scand** 53:404–422, 1961.
- PANCHALINGAM S, ANTONIO M, HOSSAIN A, et al. Diagnostic Microbiologic Methods in the GEMS-1 Case/Control Study. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**. 2012
- PATON, A.; PATON, J. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA , rfb O111 , and Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx 1 , stx 2 , eae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.
- PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, jan.2012
- PUÑO-SARMIENTO, J., et al., Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Vet. Microbiol.** 2013
- QADRI, F. et al. Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3961–3968, 2007.
- QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 3, p. 465–83, 2005.
- REGUA-MANGIA, A. H. et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 1, p. 27–34, 2009.
- RILEY L. W. , REMIS R. S. , HELGERSON S. D. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* Serotype. **New England Journal of Medicine**; 308(12):681–5. 1983
- SANSONNETTI, P. J.; KOPECKO, D. J.; FORMAL, S. B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 3, p. 852–860, 1982.
- SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 4, p. 1450–1455, 1991.
- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.

- SCHEUTZ, F. et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951–2963, 2012.
- SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, p 134-156, 2008.
- SEARS C.L., KAPER J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev** 60: 167-215, 1996.
- SHERLEY M., GORDON D.M. & COLLIGNON P.J., Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology** 150:1539-1546, 2004
- SILVA, C. V. O. et al. *Escherichia colina* suinocultura. Aspectos clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 288–293, 2015.
- SILVA, J. A.; DIAS, W. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia colicomensal*, adere, sinaliza e lesa enterócitos. Juliana Azevedo Silva e Wilmar Dias da Silva. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 3, p. 175–196, 2006.
- SILVA, R. M.; TOLEDO, M. R. F., TRABULSI L. R. Biochemical and Cultural characteristics of Invasive *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. 11:441-444, 382. 1980
- SOBESTIANSKY J., BARCELLOS D., MORENO A.M., CARVALHO L.F.O.S. & DONIN D.G. Exame de rebanho, p.23-67. In: Sobestiansky J. & Barcellos D. (Eds), **Doenças dos Suínos**. 2ª ed. Cãnone Editorial, Goiânia. 2012
- SPANGLER B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol Rev** 56: 622-647, 1992.
- SPITZER, F. et al. A standardised challenge model with an enterotoxigenic F4+ *Escherichia coli* strain in piglets assessing clinical traits and faecal shedding of fae and est-II toxin genes. **Archives of Animal Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 448–459, 2014.
- STEINSLAND, H. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections and diarrhea in a cohort of young children in Guinea-Bissau. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1740–7, 2002.
- STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 114–117, 2001.
- STIRM S, ORSKOV I, ORSKOV F. K88, an episome-determined protein antigen of *Escherichia coli*. **Nature** 209:507–508, 1966.
- TACKET C.O., REID R.H., BOEDEKER E.C., LOSONSKY G., NATARO J.P., BHAGAT H., EDELMAN R. Enteral immunization and challenge of volunteers given

enterotoxigenic *E. coli* CFA/II encapsulated in biodegradable microspheres. **Vaccine** 12:1270–1274, 1994.

TANIUCHI, M. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 2, p. 121–128, 2012.

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

TAUSCHEK, M. et al. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 7066–71, 2002.

TRABULSI, L.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, 2002.

TZIPORI, S. Montanaro, J., ROBINS-BROWNE, R. M., VIAL, P., GIBSON, R., LEVINE, M. M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 5302–5306, 1992.

VAN BEERS-SCHREURS, H. M. et al. **The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: a review.** *The Veterinary quarterly*, 1992.

VIBOUD, G. I. et al. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2829–33., 1999.

WALKER, R. I.; STEELE, D.; AGUADO, T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Disease, **Vaccine**, v. 25, p. 2545–2566, 2007.

WENNERÅS, C.; ERLING, V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 370–382, 2004.

YU, J.; KAPER, J. B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 411–417, 1992.

ZEN, S. D., ORTELAN, C. B.; IGUMA, M. D.; SUÍNOS/CEPEA, E. Gráfico 1. Produção, consumo, importação e exportação de carne suína. Fonte: FAS/USDA (2014). Elaboração: Cepea/Esalq-USP. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - www.cepea.esalq.usp.br 1. **Informativo CEPEA**, p. 1–4, 2014.

ZHANG, W. et al. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3107–3114, 2006.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar cepas de *E. coli* diarreiogênicas em suínos na região norte do Paraná, Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar amostras de *E. coli* em fezes de suínos com manifestação clínica de diarreia ou sadios.
- Determinar a presença de fatores de virulência das amostras de *E. coli* obtidas.
- Caracterizar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados de *E. coli*.
- Caracterizar a capacidade de adesão e invasão dos isolados de *E. coli*

5. ARTIGO CIENTÍFICO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* EM SUÍNOS NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

ABSTRACT

Diarreogenic *Escherichia coli* (DEC) represents the main causative agents of diarrhea in swine. As bacterial enteritis, DEC entails important economic losses in the Brazilian swine industry, for this reason, the present study aimed to characterize the main genes of virulence, antimicrobial resistance and the capacity of adhesion in HeLa cells. A total of 172 strains of *E. coli* were obtained from 87 animals from 10 properties in the northern region of the state of Paraná, Brazil. Of these samples, 76% presented resistance at least one to the class of antimicrobial agents, where the most prominent were Sulfamethoxazole + Trimethoprim (60%) and Tetracycline (56%). In the HeLa cell adhesion assay, 50% of the samples showed localized adhesion (LA), and in the Polymerase Chain Reaction (PCR) a total of 53 samples showed at least one or more virulence genes, that characterize them as DEC. Among the pathotypes identified as DEC, were obtained 11.6% of ETEC, 6.9% of EAEC, 5.8% of STEC, 4.6% of EPEC, 3.5% of EHEC and 1.2% of EIEC strains. The most commonly virulence gene observed was the STa gene, with a total of 8,13% of the strains.

Keyword: swine breeding; antimicrobial resistance; colibacillosis, diarrhea.

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade de destaque no cenário nacional e mundial. O consumo de carne suína no Brasil cresceu consideravelmente nos últimos anos, e colaborou com o aumento da produção, que alcançou mais de 3 mil toneladas de carne suína, colocando o país em 4º lugar no ranking mundial (ABPA, 2017).

Escherichia coli é uma bactéria de grande importância na etiologia de diarreia pós desmame em leitões, e promove grandes prejuízos ao setor. Segundo Nataro et al., (1998), amostras de *E. coli* responsáveis por infecções intestinais são denominadas *E. coli* Diarreiogênicas (DEC). Este grupo de microrganismos possui diversos fatores de virulência encontrados em determinadas cepas, e tais fatores têm sido alvo de inúmeros estudos que relacionam sua presença à epidemiologia de doenças entéricas causadas por *E. coli* (ARANDA et al, 2007; PATON; PATON, 1998). Além de fatores de virulência, este patógeno possui amplos mecanismos de resistência a antimicrobianos, e a transmissão horizontal somada a estes mecanismos, implica em sérias consequências para a saúde pública, já que a ocorrência de enfermidades como a Colibacilose neonatal, por exemplo, encoraja o uso indiscriminado de antimicrobianos nas rações e também como tratamento profilático nos animais (BRITO; TAGLIARI, 2000; SILVA et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi isolar cepas de *E. coli* diarreiogênicas de origem suína e caracterizar fatores de virulência e perfil de resistência aos antimicrobianos, dos isolados, na região norte do Paraná, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram realizadas dez coletas em dez propriedades e granjas de suínos, denominados A, B, C, D, E, F, G, H, I e J, na região norte do estado do Paraná. Em sua maioria, as coletas foram realizadas em propriedades próximas à cidade de Londrina, Bandeirantes, Assaí, Florestópolis, Jaguapitã, Ibiporã e Alvorada do Sul.

As coletas foram feitas durante os meses de junho de 2016 a maio de 2017, e em cada uma delas, os sistemas de produção eram variados, em sua maioria, extensivos de subsistência, utilizando raças suínas rústicas tipo banha de pequeno

porte, sistema Intensivo de suínos criados ao ar livre (SISCAL) e, em duas propriedades, sistema intensivo confinado tradicional, com linhagens comerciais. Em cada coleta, foram selecionados aleatoriamente dez animais, entre eles, machos e fêmeas, de idade e peso variados. No momento da coleta, foi observada a presença ou ausência de sinais clínicos como diarreia e letargia. O material de coleta utilizado foram Swabs, introduzidos diretamente na ampola retal dos animais, e rapidamente acondicionados em meio próprio para transporte – Cary-Blair. Em seguida, o material foi encaminhado imediatamente para o laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Uel, para posterior isolamento de colônias de *E. coli* através de semeadura em meio Ágar MacConkey (Oxoid®), com incubação por 18 a 24 horas a 37°C.

As amostras de *E. coli* utilizadas como controle foram: EAEC O42 (*aggR*, *aaiC*, *aatA*, *Aaprobe*), EPEC E2348/69 (*eae*, *bfp*), EHEC EDL933 (*eae*, *hlyA*, *Stx1*, *Stx2*), EIEC EDL1284 (*ipaH*), DH5 α (controle negativo) e HB101 (controle negativo).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina – CEUA, sob o protocolo Nº 322.2018.33.

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS

Entre suínos machos e fêmeas, haviam 9 animais entre 60, 90 dias e adultos acima de 1 ano; e 78 animais com menos de 30 dias. Destes, apenas 18 apresentavam quadro de diarreia no momento da coleta, enquanto os demais animais apresentavam condições de higidez.

Para o isolamento bacteriano, o material fecal foi semeado em ágar MacConkey (Oxoid®), e incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Das placas com crescimento de colônias típicas para *E. coli*, três a cinco colônias foram coletadas e submetidas aos testes de EPM, MILi (PROBAC®) e Citrato de Simmons (Difco®).

As amostras confirmadas como *E. coli* foram estocadas em microtubos contendo ágar estoque, e congeladas em caldo BHI (Difco®) com 25% de Glicerol (Merck®) a -20°C e -80°C, para posteriores experimentos.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA

Todas as amostras confirmadas como *E. coli* foram submetidas a um processo de extração de DNA por fervura, no qual foram fervidas por 10 minutos, e posteriormente, centrifugadas a 15000xg por 8 minutos, e o sobrenadante foi utilizado como amostra para os testes de de PCR.

Os protocolos utilizados para PCR foram os recomendados por Paton e Paton (1998), e Aranda et al. (2007), ambos com modificações.

A caracterização dos patótipos de DEC foi realizada através de PCR, tendo como alvo os seguintes genes: *eae*, *bfp*, *aggR*, *elt*, *est*, *ipaH*, *stx*, *hly*, *stx1* e *stx2* inicialmente.

Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com GelRed (Biotium®) diluído a 1:1000 (1µl de GelRed para 1000µ de água miliQ), e visualizados em transiluminador de UV (digital L PIX Loccus Biotecnologia).

2.4 TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR

As amostras de DEC foram submetidas ao teste de antibiograma seguindo a metodologia descrita pelo “Clinical Laboratory Standarts Institute” (CLSI) (2017), de acordo com os perfis de suscetibilidade recomendados.

Os agentes antimicrobianos testados foram: Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20µg, Aztreonan 30µg, Cefotaxima 30µg, Cefepime 30 µg, Ceftazidima 30µg, Cefazolina 30µg, Ácido Nalidíxico 30µg, Cloranfenicol 30µg, Gentamicina 10µg, Tetraciclina 30µg, Fosfomicina 200µg, Ciprofloxacina 5µg, Amoxicilina 20µg e Sulfa+Trimetropim 1,25 µg. Todos os discos impregnados com os antimicrobianos foram obtidos comercialmente (Oxoid®). Junto dos testes de antibiograma, os isolados foram testados para produção de ESBL, realizada pela técnica de disco aproximação, também segundo as normas do CLSI. Nesta técnica, utilizam-se cinco discos de antibióticos (Aztreonam 30µg, Cefotaxima 30 µg, Ceftazidima 30µg, Ceftriaxona 30 µg e Amoxicilina + Clavulanato 30 µg) onde o halo de inibição indica a produção ou não de ESBL.

2.5 ENSAIO DE ADESÃO EM CÉLULAS HeLa

A capacidade das amostras obtidas, em aderir em determinados tecidos foi verificada utilizando culturas celulares de linhagem HeLa, através da metodologia descrita por Cravioto et al. (1979), com modificações. A presença e os tipos de aderência bacteriana foram determinadas por comparação com os resultados das linhagens padrões utilizadas, que apresentam padrões de adesão Localizada (AL), adesão Difusa (AD), adesão Agregativa (AA) e adesão Localizada-Like (ALL) (Scaletsky, 1984).

As células HeLa foram cultivadas a 37°C por 24 horas, em garrafas apropriadas, contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen®) acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) (Invitrogen®), e 1% de Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen®). A monocamada celular foi obtida com uma suspensão celular homogênea. Um volume de 0,5 ml dessa suspensão foi distribuído em cada orifício da microplaca com 24 orifícios, onde previamente foram colocadas em cada orifício, lamínulas redondas esterilizadas de 13 mm de diâmetro. A microplaca foi então incubada a 37°C por 24-48 horas, sob atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação em microscópio invertido, e a cultura foi considerada ideal para o teste após atingir 80% de confluência. As amostras bacterianas isoladas e identificadas neste estudo, bem como as amostras controles foram semeadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Kasvi®) e incubadas por 18 horas a 37°C. Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão PBS (Tampão fosfato-salino) esterilizado, e em cada orifício foi adicionado 1,0 ml de DMEM, suplementado com 2% de SFB e 3% de D-manose (Sigma-Aldrich®). Em seguida, um volume de 40 µL de amostra bacteriana crescida por 18 horas em caldo LB foi adicionada a cada orifício. Após incubação a 37°C durante 3 horas, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com tampão PBS para eliminar as bactérias não aderidas às células HeLa. As amostras foram testadas em duplicata, com um controle positivo e um controle negativo em cada ensaio.

As microplacas foram reincubadas com meio DMEM, suplementado com 2% de SFB a 37°C por 3 horas (correspondente ao período de multiplicação bacteriana), e as células foram novamente lavadas três vezes com 1 µL de PBS cada orifício, e fixadas com 3 a 5 µL de metanol (Merck®), por de 15 minutos. Depois de fixadas, as

preparações foram coradas durante 10 minutos com May-Grunwald (Sigma-Aldrich®) e 10 minutos com Giemsa (Sigma-Aldrich®). Após a coloração, as lamínulas foram observadas em microscópio óptico, com a objetiva de 100x. Para a definição do tipo de adesão foram utilizados critérios descritos por (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

3. RESULTADOS

3.1 ISOLAMENTO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Foram obtidas 172 amostras de *E. coli* das quais, 21 amostras (12,2%) apresentaram um ou mais genes que as caracterizassem dentro de algum patotipo de DEC. Estes resultados foram compatíveis com os testes de adesão em células HeLa descrito por Scaletsky et al. (1984).

Dos isolados de DEC, obtivemos 21 isolados de ETEC (39,6%), onde dos genes de virulência que a caracteriza, o prevalente foi *STa* com 14 amostras (66,6%), *ELT* em 6 amostras (28,5%) e *STb* em apenas uma amostra (1,8%). Todos os 10 isolados confirmados como STEC (18,8%) através da presença de *Stx*, apresentaram especificamente o gene *Stx2*.

EAEC foi o patotipo que apresentou 9 isolados (42,8%) pela detecção dos genes *aatA* em 4 isolados (33,3%), *aap* e *aaProbe* em 3 isolados (25%), e *aaiC* em apenas 1 isolado (8,3%). O gene *aggR* não foi detectado.

O patotipo EPEC - caracterizado pela presença do gene *eae*, apresentou apenas 10 amostras positivas (47,6%), contendo o gene *eae* em todas elas. Por fim, o patotipo EIEC foi o menos encontrado, em apenas duas amostras (3,7%) contendo o gene *ipaH*.

A presença de diarreia foi observada em 18 animais (20,6%), e das amostras obtidas deste total, 14 isolados foram positivos para DEC (77,7%) apresentando algum gene de virulência. Os genes descritos na tabela sugerem a possibilidade das amostras analisadas serem de cada patotipo descrito. Para confirmar, são necessários mais testes genotípicos.

Tabela 2- Características genóticas e fenóticas de *Escherichia coli* diarréio-gênicas isoladas de suínos, na região Norte do Paraná entre junho de 2016 a maio de 2017

AMOSTRA	PATOTIPO	GENES DE VIRULÊNCIA	PADRÃO DE ADESÃO	FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA	QUADRO DE DIARREIA
A1.1	STEC/EIEC	<i>Stx2, ipaH</i>	AL	FOS,TET	Ausente
A1.2	STEC/EIEC	<i>Stx2, ipaH</i>	AL	FOS, TET	Ausente
B2.2	EPEC	<i>eae</i>	AD	TET,SXT	Ausente
B3.1	EPEC	<i>eae</i>	AL	TET, GEN,CLO,NAL, SXT	Ausente
B10.2	STEC	<i>Stx2</i>	S/C	TET,CLO,NAL,SXT	Ausente
C1.1	EPEC	<i>eae</i>	S/A	SXT	Ausente
C3.2	EPEC	<i>eae</i>	AL	AMC,AMO,SXT	Ausente
C3.4	EPEC	<i>eae</i>	AL	SXT	Ausente
C5.4	EPEC	<i>eae</i>	AL	SXT	Ausente
C7.2	EAEC	<i>aatA</i>	AA	SXT	Ausente
D1.2	EAEC	<i>eae, Aaprobe, aaP</i>	S/A	TET, SXT	Ausente
D1.3	EPEC/EAEC	<i>eae,Aaprobe,aaP</i>	AL	TET, SXT	Ausente
D1.5	EPEC/EAEC	<i>eae,Aaprobe,aaP</i>	S/A	TET, SXT	Ausente
E4.3	STEC/EAEC	<i>Stx2,aatA</i>	S/A	TET, SXT	Ausente
E5.1	EAEC	<i>aatA</i>	S/C	Sensível	Ausente
E6.1	EPEC	<i>eae</i>	AL	Sensível	Ausente
H3.1	EAEC	<i>aatA</i>	S/A	Sensível	Presente
H6.1	*N/C	*N/C	AL	ATM, FOS, TET, NAL, SXT	Presente
I5.2	STEC	<i>Stx2</i>	AL	TET, SXT	Ausente
I5.3	STEC/EAEC	<i>Stx2, aaic</i>	AD	TET	Ausente
I10.3	EAEC	<i>aatA</i>	S/A	TET, NAL	Ausente

*N/C – Não Caracterizada: amostras que apresentaram somente o gene *hly* precisam de mais testes genotípicos afim de serem definidas em algum patotipo de DEC. Apenas a presença do gene *hly* não as caracteriza em nenhum dos patotipos.

3.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Dos 53 isolados de DEC, foram testadas 25 amostras, onde 21 amostras (84%) apresentaram resistência à, pelo menos uma droga antimicrobiana.

Algumas amostras apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos, de diferentes classes, num total de 15 drogas testadas. Destaca-se a resistência para Sulfametoxazol + Trimetoprima (60%) e Tetraciclina (56%), seguidos de Ácido Nalidíxico (24%), Fosfomicina (12%), Cloranfenicol (12%), Amoxicilina (4%), Gentamicina (4%) e Amoxicilina + Clavulanato (4%). Nenhuma amostra apresentou perfil ESBL (Tabela 2).

Tabela 2- Perfil de resistência das amostras de *Escherichia coli* Diarreigênicas isoladas de suínos na região norte do Paraná, no período de junho de 2016 à maio de 2017.

ANTIMICROBIANO	AMOSTRAS RESISTENTES
AMC	4%
AMO	4%
ATM	4%
CAZ	0
CFO	0
CFZ	0%
CIP	0%
CLO	12%
CTX	0
FOS	12%
GEN	4%
NAL	24%
SXT	60%
TET	56%

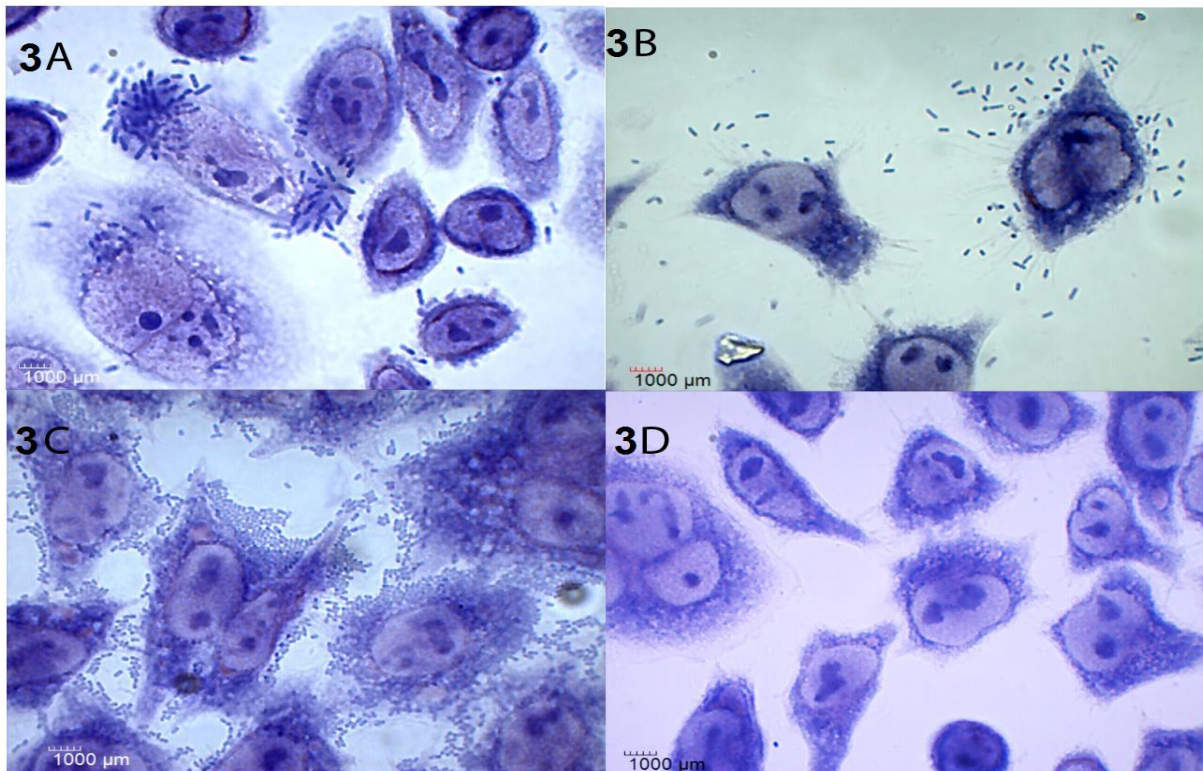
Antimicrobianos utilizados: AMC, Amoxicilina + Ácido Clavulânico; ATM, Aztreonan; CFO, Cefotaxima; CAZ, Ceftazidima; CFZ, Cefazolina; NAL, Ácido Nalidíxico; CLO, Cloranfenicol; GEN, Gentamicina; TET, Tetraciclina; FOS, Fosfomicina; CIP, Ciprofloxacina; AMO Amoxicilina; SXT, Sulfa+Trimetoprima.

3.4 ENSAIO DE ADESÃO EM CÉLULAS HeLa

Para as amostras de DEC, observaram-se cepas que apresentaram padrão de adesão localizada (AL), adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), amostras sem adesão (S/A) e amostras em que não havia células ao final do ensaio (S/C).

A figura 3 indica os diferentes tipos de adesão observados nos isolados. Na figura 3A, 3B e 3C, podemos observar o padrão de três amostras com adesão AL, AD e AA, respectivamente. O controle negativo encontra-se na figura 3D. Os testes mostraram que o padrão de adesão predominante dos isolados foi AL (50%), enquanto 27% das amostras não apresentaram adesão de nenhum padrão. Apenas 5% apresentou adesão AA, junto do gene *aaic*, descrito por Lima (2013), o que nos mostra que mesmo não apresentando o gene *aggR*, a bactéria apresentou capacidade para realizar padrão agregativo. Em 9% das, não havia células ao final do experimento.

Figura 3- Padrões de adesão em células HeLa com amostras de DEC isoladas de suínos na região norte do Paraná.



3A – Padrão de adesão Localizado (AL) em células HeLa
 3B – Padrão de adesão Difusa (AD) em células HeLa
 3C – Padrão de adesão Agregativo (AA) em células HeLa
 3D – Amostra negativa para adesão em células HeLa
 Fonte: O próprio autor

4. DISCUSSÃO

E. coli é um microrganismo ubíquo, de simples cultivo. Por ser encontrado na microbiota de muitas espécies animais, e no caso deste estudo, na espécie suína, seu isolamento e identificação não ofereceu muitas dificuldades.

A presença dos genes de virulência encontrados, caracterizando todos os patotipos descritos por Nataro e Kaper (1998), destaca a importância que DEC pode ter na produção de suínos. O total de amostras de DEC isoladas a partir de variados modelos de criação de suínos na região norte do Paraná, nos mostra que mesmo não havendo quadros entéricos em todos os locais de coletas, ainda foi possível isolar patotipos importantes para a saúde pública e animal.

ETEC foi observada em 37,7% das amostras, o que nos mostra que este é o patotipo mais prevalente em suínos no presente estudo e também em casos de diarreia pós desmame, descrito por Dubreuil, Isaacson e Schiefferli (2016), e Moredo

e colaboradores (2012). No entanto, apenas 6 isolados (28,5%) de ETEC foram obtidos a partir de animais apresentando diarreia, enquanto 15 isolados (71,4%) de ETEC eram provenientes de animais sem diarreia. Moredo e colaboradores (2015) demonstraram que cepas de ETEC em suínos sem diarreia podem ocorrer em 16,6% durante o período de lactação, 66% dos casos na fase de creche e 17,3% em suínos em terminação.

Parma e colaboradores (2000) reportaram não ter encontrado genes de virulência característicos de ETEC e STEC em seus isolados. Ao contrário de Moredo e colaboradores (2012) que mostrou resultados similares, mas em animais sem sinais clínicos.

A ausência de sinais clínicos e doença entérica em animais que apresentaram serem portadores de patótipos de DEC podem estar relacionadas às condições adequadas de higiene. Todavia, no presente estudo, propriedades que apresentavam condições adequadas de higiene e manejo, apresentaram isolados de DEC contendo gene *Stx2* e *ipaH* (STEC/EIEC), considerados importantes em *E. coli* responsáveis por surtos de diarreia em humanos e doença do edema em suínos.

Moredo e colaboradores (2015) não descrevem *eae* em seu trabalho, no entanto, Bessone e colaboradores (2017) obtiveram 8 amostras contendo o gene *eae* e no presente estudo, 13 amostras positivas para o gene de EPEC em um número bem menor de animais submetidos ao experimento quando comparado à Bessone e colaboradores (2017). O gene *bfpA* não foi detectado em nenhuma amostra deste estudo, caracterizando assim, as EPEC encontradas como atípicas.

Das toxinas Shiga buscadas, apenas *Stx2* foi encontrada, em 10 amostras (18,8%), e em duas amostras, junto de *Stx2*, está o gene de virulência *hly*, considerado um gene de virulência importante de STEC (RIVAS et al., 2006). O mesmo aconteceu no presente estudo com o gene que caracteriza o patótipo EHEC, onde todas as seis amostras (11,3%) detectadas, apresentaram o gene *hlyA*. Este fato sugere que suínos com diarreia pós desmame ou doença do Edema podem ser reservatórios de cepas patogênicas de *E. coli*. Suínos que carregam cepas com genes para a SHU podem potencialmente levar ao aparecimento de surtos da doença, não apenas pela possibilidade de contaminação ambiental, mas também pela participação de suínos na cadeia alimentar.

Uma grande proporção de genes STb e LT é descrita no trabalho de Bessone e colaboradores (2017), ao contrário do presente estudo, onde o gene de virulência mais prevalente foi STa associado a amostras de ETEC.

Duas amostras do presente estudo apresentaram genes de virulência para STEC e ETEC, assim como é descrito nos trabalhos feitos por Moredo e colaboradores (2015), Bessone e colaboradores (2017) e Nágý e Fekete (2005). Os trabalhos citados também apresentam similaridade entre patotipos de DEC com genes de virulência relacionados à presença de resistência a antimicrobianos testados.

Apesar de o patotipo EAEC ser pouco descrito em suínos, Kacambèga e colaboradores (2012), descreve o patotipo em 32% de suas amostras de fezes suínas, se aproximando do valor encontrado neste estudo, onde EAEC foi encontrada em 22,6% das amostras.

A detecção de EIEC em suínos carece de mais pesquisas, porém neste estudo, 3,7% dos isolados foram caracterizados como EIEC, o que não exclui a presença do patotipo em suínos e pode afirmar a necessidade de conhecermos melhor este patotipo e seu comportamento na espécie suína.

Os testes utilizados para detecção molecular de genes de virulência, foram baseados nos protocolos descritos por Paton e Paton (1998) e Aranda e colaboradores (2007). Ambos os protocolos foram desenvolvidos para a detecção de *E. coli* diarreiogênica em humanos e não em animais. Este é um fator importante, onde no presente estudo gerou dificuldades na leitura de géis de agarose, contendo os amplicons das amostras.

Atualmente, é sabido que existe certa semelhança genética entre suínos e humanos, contudo, a microbiota intestinal revela-se muito variada para cada espécie e indivíduo.

O protocolo descrito por Paton e Paton (1998) por ser multiplex, facilita a técnica por permitir a busca de mais de um gene de virulência em uma mesma reação, utilizando iniciadores individuais para cada gene. A facilidade na técnica também é descrita por Costa e colaboradores (2009). No entanto, a inespecificidade de bandas foi observada com frequência no presente estudo, onde muitos genes em uma mesma reação causaram dificuldades na leitura e interpretação dos resultados ao final do teste. Lembrando que isto não desmerece a qualidade das técnicas

descritas por estes autores, pois diversos pesquisadores ainda utilizam estes protocolos como padrão para a detecção inicial de DEC.

O mesmo aconteceu com o protocolo de PCR multiplex descrito por Aranda e colaboradores (2007), onde são buscados sete genes em uma mesma reação. A solução encontrada para esta dificuldade foi realizar as PCRs separadamente para cada gene, contudo, isto fez com que os resultados levassem mais tempo para serem obtidos.

De acordo com Gomes e colaboradores (1998), o padrão de adesão agregativo é o que determina que a cepa de DEC seja uma EAEC. Contudo, nos resultados obtidos no presente estudo, das amostras que apresentaram genes para EAEC apenas uma apresentou padrão agregativo, comparada às outras amostras que não o apresentaram. Contudo, estes isolados possuíam genes de virulência encontrados em cepas EAEC, como os genes *aap*, *aaiC*, *aatA* e *aaProbe*. Estes genes são descritos para a detecção de cepas de *E. coli* enteroagregativas que não apresentam o gene *aggR*, mesmo realizando adesão agregativa (AA) em ensaios de adesão (CERNA; NATARO; ESTRADA-GARCÍA, 2003).

A técnica de adesão em células descrita por Scaletsky e colaboradores (1984) se mostrou ser segura para observar o padrão de adesão dos isolados de DEC em células HeLa.

De 25 amostras testadas, um total de 20 amostras (80%) apresentou perfil de resistência à pelo menos um antimicrobiano. Dos antimicrobianos testados, da classe das Sulfonamidas (Sulfametoxazol + Trimetoprima), 14 amostras (56%) eram resistentes e da classe das Tetraciclina, 13 amostras (53%) apresentaram resistência, sendo estes os antimicrobianos em que mais foi observada resistência. A alta frequência de resistência a estas duas classes de antimicrobianos em suínos, também é descrita por outros autores há quase vinte anos (BRITTO e TAGLIARI, 2000; DUNLOPP, 1999; PISSETTI, 2016; WEBER et al., 2017).

O patotipo ETEC é descrito por Silva, Oliveira e colaboradores (2015) como sendo o que mais apresenta resistência a antimicrobianos. Contudo, no presente estudo, o patotipo EPEC foi o que mais apresentou resistência (40%), e em seguida, os patotipos ETEC, EAEC e STEC com 20% de resistência cada um. A resistência à Sulfametoxazol+ Trimetoprima e à Tetraciclina foram as mais observadas em nosso estudo, sendo também descrito em perfis de resistência em cepas de *E. coli* isoladas de suínos por Stephan e Schumacer (2001) na Suíça e em Portugal por Pena e

colaboradores (2004). Segundo Stephan e Schumacer (2001), a alimentação dos suínos contendo estes antimicrobianos utilizados de forma indiscriminada, colaborou para o aumento do perfil de resistência no país.

Britto e Tagliari (2000) descreveram cepas de DEC com resistência à Gentamicina (96%), à Sulfametoxazol + Trimetoprima (67,4%), ao Cloranfenicol (56,7%) e à Tetraciclina (26,3%) em suínos no estado do Paraná, de 224 amostras isoladas. Diferente do numero obtido no presente estudo, onde Gentamicina é observada com o menor numero de cepas resistentes. No entanto, os números para Sulfametoxazol + Trimetropim e Tetraciclina seguem altos, quando comparados aos outros antimicrobianos, como no estudo de Britto e Tagliari (2000).

Para discorrer sobre os outros patotipos de DEC resistentes na espécie suína, ainda são necessários mais estudos.

O perfil ESBL não foi encontrado em nenhuma amostra do presente estudo, ao contrario do que descreve Dohmen (2017), em seu trabalho com suínos na Holanda, onde 13% das amostras estudadas apresentaram perfil ESBL.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que cepas de DEC isoladas de suínos, ocorrem mesmo em pequenas propriedades, podendo ser a espécie suína mais um reservatório para um microrganismo de importância na saúde pública e veterinária. A prevalência de cepas de DEC resistentes nos mostra a importância do controle e redução da utilização de antimicrobianos na produção animal. As cepas de DEC isoladas no presente estudo e seus variados genes de virulência mostram a necessidade de continuarmos a pesquisa deste microrganismo, pois alguns patótipos importantes para a veterinária não possuem literatura suficiente para determinadas espécies, como é o caso de EIEC em suínos, por exemplo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Relatório Anual da ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, p. 134, 2017.
- ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145–150, 2007.
- BESSONE, F. A. et al. Presence and characterization of *Escherichia coli* virulence genes isolated from diseased pigs in the central region of Argentina. **Veterinary World**, v. 10, n. 8, p. 939–945, 2017.
- BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões lactentes com diarreia. v. 7, n. 2, p. 117–119, 2000.
- CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2138–2140, 2003.
- CLSI, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Vol. 27. 2017
- CRAVIOTO, A., GROSS, R. J., SCOTLAND, S.M. and ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.** 3, 95-99. 1979
- COSTA, A. R. F. et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreogênicos. **Revista Pan-Amaz Saude, Ananindeua**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.
- DOHMEN, W. et al. Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.
- DUBREUIL, J.D., ISAACSON R.E., SCHIFFERLI D.M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**. 7(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0006, 2016.
- DUNLOP, R.H.; McEWEN, S.A.; MEEK, A.H. et al. Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. **Epidemiol. Infect.**, v.122, p.485-496, 1999.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheogenic *Escherichia coli* **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.
- KAGAMBÈGA, A. et al. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. **MicrobiologyOpen**, v. 1, n. 3, p. 276–284, 2012.

- LIMA, I. F. N. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART5, p. 683–693, 2013.
- MOREDO FA, PIÑEYRO PE, MÁRQUEZ GC, SANZ M, COLELLO R, ETCHEVERRÍA A, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles. **Foodborne Pathogenical Diseases**. 12(8):704–11. 2015
- MOREDO, F., CAPPUCCHIO, J., INSARRALDE, L., PERFUMO, C., QUIROGA, M., LEOTTA, G. Genotypic characterization of toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea (PWD) and edema disease (ED). **Revista Argentina de Microbiología**. 44: 85-88. 2012
- NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 443–454, 2005.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1 p. 142-201, jan. 1998.
- NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 4 N° 2, April-June 1998.
- PARMA, A. et al. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 269–276, 2000.
- PATON, A.; PATON, J. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex Enterohemorrhagic E . coli hlyA , rfb O111 , and Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx 1 , stx 2 , eae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.
- PENA, A. et al. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 8, p. 749–755, 2004.
- PISSETTI, C.; WERLANG, G. O.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. Detection of genotypically related multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pig feces and carcasses. **Acta Scientiae Veterinariae** v. 44 p 1376 ref. 22, 2016
- RIVAS, M., MILIWEBSKY, E., CHINEN, I., DEZA, N. AND LEOTTA, G. The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. **Medicina Buenos Aires**, 66(3): 27-32. 2006
- SCALETISKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infectious Immunology**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.
- SILVA, C. V. O. et al. *Escherichia coli* na suinocultura. Aspectos Clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.9, n.2 p.288-293, 2015

- SILVA, C. V. O. et al. *Escherichia colina* suinocultura. Aspectos clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 288–293, 2015.
- STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 114–117, 2001.
- WEBER, N. R. et al. Comparison of bacterial culture and qPCR testing of rectal and pen floor samples as diagnostic approaches to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* in nursery pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 143, p. 61–67, 2017.

7. Apêndices

7.1 Cary-Blair

Na ₂ HPO ₄	1,1g
C ₂ H ₃ NaO ₂ S.....	1,5g
NaCl.....	5,0g
CaCl ₂	0,09g
Ágar.....	5,6g
Água Destilada/Deionizada q.s.p.....	1000 mL

7.2 Ágar-Estoque

Neopeptona.....	2g
Extrato de Carne.....	1g
NaCl.....	0,5g
Ágar.....	6g
Água Destilada/Deionizada q.s.p.....	500 mL

7.3 PBS (Salina Tamponada)

Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O.....	1,98g (0,01M)
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O.....	0,36g (0,03M)
NaCl.....	8,17g (0,14M)
Água Destilada/Deionizada q.s.p.....	1000 mL

8. ANEXOS

8.1 Tabelas de iniciadores utilizados para detecção de genes de virulência de acordo com seus respectivos autores.

Tabela 1 - Iniciadores para genes de virulência segundo Paton & Paton (1998)

Genes	Sequência dos iniciadores	Patotipos
<i>hly</i> (F) <i>hly</i> (R)	5'- GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC -3' 5'- AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T -3'	EHEC
<i>stx1</i> (F) <i>stx1</i> (R)	5'- ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC -3 5'- AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC -3'	STEC
<i>stx2</i> (F) <i>stx2</i> (R)	5'- GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC -3' 5'- TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G -3'	STEC

Fonte: Paton e Paton, 1998.

Tabela 2- Iniciadores segundo ARANDA et al (2004) para genes de virulência

Genes	Sequência dos iniciadores	Patotipos
<i>eae</i> (F) <i>eae</i> (R)	5'- CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA -3' 5'- CCA GAC GAT ACG ATC CAG -3'	EPEC
<i>bfpA</i> (F) <i>bfpA</i> (R)	5'- AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC -3' 5'- GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA -3'	EPEC
<i>aggR</i> (F) <i>aggR</i> (R)	5'- GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC -3' 5'- ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC -3'	EAEC
<i>elt</i> (F) <i>elt</i> (R)	5'- GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC -3' 5'- CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT -3'	EPEC
<i>est</i> (F) <i>est</i> (R)	5'- ATT TTT MTT TCT GTA TTR TCT T -3' 5'- CAC CCG GTA CAR GCA GGA TT -3'	EPEC
<i>ipaH</i> (F) <i>ipaH</i> (R)	5'- GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C -3' 5'- GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC -3'	EPEC
<i>stx</i> (F) <i>stx</i> (R)	5'- GAG CGA AAT AAT TTA TAT GTG -3' 5'- TGA TGA TGG CAA TTC AGT AT -3'	STEC

Fonte: Aranda et al., 2004

Tabela 3 - Iniciadores segundo Cerna et al., (2003) para genes de virulência de EIEC

GENE	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES	PATOTIPO
<i>aap</i> (F)	5'-CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG-3'	EAEC
<i>aap</i> (R)	5'-AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC-3'	
<i>aggR</i> (F)	5'-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA-3'	EAEC
<i>aggR</i> (R)	5'-AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG-3'	
<i>AA probe</i> (F)	5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3'	EAEC
<i>AA probe</i> (R)	5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'	

Fonte: Cerna et al., 2003

Tabela 4 - Iniciadores segundo Lima et al., (2013) para genes de virulência de EIEC

GENE	SEQUENCIA DE INICIADORES	PATOTIPO
<i>aaiC</i> (F)	ATTGTCCTCAGGCATTTTCACACGACACCCCTGATAAACAA	EIEC
<i>aaiC</i> (R)	TAACAGGAGTCCGTAAAGTGTGCTGTGGGGACTATTTGTT	
<i>aatA</i> (F)	CTGGCGAAAGACTGTATCATCAATGTATAGAAATCCGCTGTT	EIEC
<i>aatA</i> (R)	GACCGCTTTCTGACATAGTAGTTACATATCTTTAGGCGACAA	

Fonte: Lima et al., 2013.

8.2 Ficha de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 07/2018

Londrina, 23 de janeiro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Novas Amostras de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas de suínos" protocolo nº 322.2018.33, sob a responsabilidade de Gerson Nakazato, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **22/01/2018**.

O Objetivo é encontrar amostras de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas de suínos da região de Londrina com características genotípicas e fenotípicas associadas à virulência diferentes da relatada na literatura.. Grau de invasividade=1

Vigência do Projeto	01/02/2018 a 01/02/2019
Espécie/linhagem	Suíno
Nº de animais	100
Peso/Idade	1 sem – 2 anos (10-100 kg)
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Propriedades criadoras de suínos na região metropolitana da cidade de Londrina/PR.
Amostras a serem coletadas	Fezes

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Gerson Nakazato
Responsável pelo projeto
Departamento de Microbiologia/CCB

C/C para o Biotério/CCB
C/C para a Chefia do Depto de Microbiologia/CCB
C/C para a Direção de Centro/ CCB