



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO HENRIQUE MARTINS

**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**

FERNANDO HENRIQUE MARTINS

**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**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M386c Martins, Fernando Henrique.

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 / Fernando Henrique Martins. – Londrina, 2013.
77 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* – Genética – Teses. 2. Virulência (Microbiologia) – Teses. 3. Genética bacteriana – Teses. 4. Ovino – Doenças – Teses. 5. Microbiologia veterinária – Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.842

FERNANDO HENRIQUE MARTINS

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gérson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de Março de 2013.

DEDICO

Aos meus pais, minhas irmãs e meu irmão;
seres humanos espetaculares cujo
desprendimento e sacrifício propiciaram a
conclusão de mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

À minha orientadora, Dra. Jacinta Sanchez Pelayo, pela sua dedicação, orientação e carinho durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior, Dra. Roxane Maria Fontes Piazza e toda a equipe do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan pelo acolhimento, ensinamentos, colaboração e, especialmente, pela amizade.

À Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth e Dr. Jorge Blanco, pela contribuição e ajuda inestimável.

Aos colegas de laboratório Claci, Marilúcia, Tatiane, Paulo, Nicole e Bruna, pela colaboração e momentos de alegria.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia da UEL pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram, confiaram em meu trabalho e não mediram esforços para que o mesmo fosse realizado.

À minha namorada Camila, pelo amor, apoio e compreensão.

Aos meus amigos do Clube da Luta[®], Narciso Jr., Cauê, Kalil, Renato, Marcus e Daniel pelo apoio, pelos momentos de descontração e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. **Muito obrigado!**

“A diferença entre o possível e o impossível
está na vontade humana”

Louis Pasteur

MARTINS, Fernando Henrique. **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.

RESUMO

Amostras fecais de 130 ovinos sem diarreia foram investigadas quanto à presença de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). STEC e EPEC foram detectadas em 50% e 19,2% dos animais, respectivamente. Um total de 70 isolados STEC e 25 isolados EPEC foram obtidos e caracterizados com relação a sorotipos e perfis de virulência. Todos os isolados EPEC foram negativos para o gene *bfpA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e foram considerados EPEC atípicas (aEPEC). Vinte e três sorotipos foram identificados entre os isolados STEC, dos quais O76:H19, O65:H-, O75:H-, O91:H-, O128:H2 e O75:H14 foram os mais prevalentes. Nove sorotipos identificados entre STEC foram reportados anteriormente associados com síndrome hemolítico-urêmica (SHU) em humanos, incluindo O103:H2. Para nosso conhecimento, este sorotipo é descrito pela primeira vez em STEC isolada de animais no Brasil. Todos os isolados STEC produziram efeito citotóxicos em células Vero. O subtipo *stx2b* foi o mais comum entre os isolados STEC. Apenas quatro (5,7%) isolados STEC foram *eae*-positivos. Os isolados aEPEC pertenciam a 11 sorotipos, oito dos quais previamente reportados em humanos com diarreia. Os sorotipos mais frequentes em aEPEC foram ONT:H21, O2:H40, O70:H11 e O177:H11. O subtipo de intimina ϵ 1 foi o mais frequente em STEC, enquanto que β 1 foi o mais prevalente em aEPEC. O gene *ehxA* foi detectado em 87,1% e 60% dos isolados STEC e aEPEC, respectivamente. Todos os isolados STEC e aEPEC foram aderentes a células HEP-2. Nossos dados mostram que os ovinos podem ser considerados um importante reservatório de STEC e aEPEC no Brasil, uma vez que sorotipos e perfis de virulência associados com doenças em humanos foram observados.

Palavras-Chave: Ovinos. STEC. Aepec. Sorotipos. Virulência.

MARTINS, Fernando Henrique. **Genotypic and phenotypic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from sheep in northern Paraná State, Brazil.** 2013. 77 p. Master's Degree Dissertation (Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Fecal samples from 130 sheep without diarrhea were screened for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC). STEC and EPEC were detected in 50% and 19,2% of the animals, respectively. A total of 70 STEC and 25 aEPEC isolates were obtained and characterized with respect to serotypes and virulence properties. All EPEC isolates were negative for the *bfpA* gene by polymerase chain reaction (PCR), and were considered atypical EPEC (aEPEC). Twenty-three serotypes were identified among STEC isolates, of which O76:H19, O65:H-, O75:H-, O91:H-, O128:H2 e O75:H14 were the most prevalent. Nine serotypes were previously reported in association with hemolytic uremic syndrome (HUS), including O103:H2. To our knowledge, this serotype is described for the first time in STEC isolated from animals in Brazil. All STEC isolates exhibited toxic effects on Vero cells, of which 50% were considered strongly cytotoxic. The *stx2b* subtype was the most common among STEC isolates. Only four (5,7%) STEC isolates were positive for *eae* gene. The aEPEC isolates belonged to 11 serotypes, of which eight have been implicated in human diarrheal disease. The most frequent serotypes among aEPEC isolates were ONT:H21, O2:H40, O70:H11 e O177:H11. The intimin type ϵ 1 was the most frequent among STEC, whereas β 1 was the most frequent intimin type among aEPEC isolates. The *ehxA* gene was detected in 87,1% and 60% of the STEC and aEPEC isolates, respectively. All STEC and aEPEC isolates adhered to HEp-2 cells. Our data show that sheep are an important reservoir of STEC and aEPEC in Brazil, since the serotypes and virulence profiles associated with human disease were observed.

Keywords: Sheep. STEC. aEPEC. Serotypes. Virulence.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1.	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	10
2.2.	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)	11
2.3.	<i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)	13
2.4.	OVINOS COMO RESERVATÓRIO DE STEC E AEPEC	18
	REFERÊNCIAS	21
3.	OBJETIVOS	34
3.1.	OBJETIVOS GERAIS	34
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4.	TRABALHOS CIENTÍFICOS	35
5.	CONCLUSÕES	77

1. INTRODUÇÃO

Os bastonetes Gram-negativos que constituem a família Enterobacteriaceae são bactérias com elevada frequência em amostras biológicas e apresentam muitas propriedades em comum. Importantes causadores de infecções intestinais compõem essa família, destacando-se a *Escherichia coli*.

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) são duas importantes categorias de *E. coli* causadoras de infecção intestinal (diarreiogênicas), representando uma grande relevância em termos de saúde pública.

A infecção por STEC pode resultar desde uma diarreia branda até colite hemorrágica (CH), além de complicações extraintestinais graves como síndrome hemolítico-urêmica (SHU). Este patotipo apresenta uma origem zoonótica bem definida, sendo o mais importante patógeno humano encontrado em ruminantes, principalmente animais de produção como bovinos e ovinos. A transmissão de STEC a humanos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, sendo muitos surtos alimentares associados a este patotipo.

EPEC é responsável por diarreia aguda e persistente em crianças e adultos tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados. No entanto, diferentemente de STEC, EPEC não apresenta um potencial zoonótico definido, embora tenha sido constantemente detectada em várias espécies de animais, inclusive ruminantes domésticos.

A ovinocultura pode ser considerada uma importante atividade econômica no Brasil, com grandes perspectivas de desenvolvimento, uma vez que a demanda por carne de ovinos no país é cada vez maior. O Estado do Paraná possui um rebanho com cerca de 600 mil cabeças, o quinto maior do país, onde o principal interesse reside na exploração de animais para abate.

Com o acréscimo no consumo de carne ovina, também aumentam os riscos de contaminação dos humanos com cepas patogênicas de *E. coli*, como STEC e EPEC. Devido aos possíveis perigos acarretados à saúde pública por estes patotipos, são necessários estudos que evidenciem a distribuição e frequências destas cepas nos animais, além das características de virulência, no sentido de melhor conhecer a epidemiologia dessas infecções.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *ESCHERICHIA COLI*

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* foi descrita primeiramente em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodore Escherich, sendo naquela ocasião denominada como “*Bacterium coli commune*”. *E. coli* é um bastonete anaeróbio facultativo, constituinte da microbiota intestinal do homem e dos animais, sendo a espécie comensal predominante nestes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

No entanto, determinadas cepas de *E. coli* são reconhecidamente patogênicas devido à presença de um ou mais genes de virulência encontrados em elementos genéticos, como plasmídeos, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade e transposons. *E. coli* patogênicas podem provocar doença intestinais e extraintestinais em humanos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Análises filogenéticas têm mostrado que cepas de *E. coli* são classificadas em quatro principais grupos, A, B1, B2 e D. A distribuição em grupos filogenéticos tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli* patogênicas, além de contribuir para o entendimento de como os genes de virulência são adquiridos (CLERMONT *et al.*, 2000).

E. coli associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e estão agrupadas em seis categorias (ou patotipos), considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes que causam, os sorotipos, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Esses grupos de DEC são classificados como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC). Embora essa classificação continue sendo amplamente empregada, tem sido demonstrado que algumas categorias incluem micro-organismos distintos. Desta forma, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.2. *Escherichia Coli* Enteropatogênica (EPEC)

O termo “*Escherichia coli* enteropatogênica” foi criado por Neter *et al.* (1955) para designar cepas de *E. coli* epidemiologicamente associada à diarreia infantil e distinguí-las das comensais. Embora EPEC tenha sido o primeiro patotipo de DEC identificado, seu potencial patogênico só foi confirmado e aceito anos depois, após estudos com voluntários que ingeriram o micro-organismo e apresentaram sintomas evidentes de diarreia (LEVINE *et al.*, 1978).

Por definição, EPEC são *E. coli* diarreio gênicas que têm a capacidade de formar a lesão *attaching and effacing* (A/E) em enterócitos e não produzem toxina Shiga (KAPER, 1996). As cepas mais estudadas de EPEC pertencem a uma série de doze sorogrupos (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158), denominados sorogrupos clássicos de EPEC (WHO, 1987).

O mecanismo central de patogenicidade de EPEC é a formação da lesão histopatológica A/E, que resulta da adesão íntima da bactéria ao enterócito e promove a destruição das microvilosidades do epitélio, levando à polimerização da actina e ao rearranjo das proteínas do citoesqueleto, o que resulta na formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito, sobre o qual a bactéria encontra-se aderida (MOON *et al.*, 1983).

A formação da lesão A/E requer a expressão de vários genes localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossomal de 35 kb, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (McDANIEL *et al.*, 1995), que codifica os componentes estruturais de um sistema de secreção do tipo III (T3SS), reguladores, translocadores, chaperonas e moléculas efetoras que alteram os processos de sinalização celular (GARMEDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). A região LEE também possui os genes *eae* (*EPEC attaching and effacement*) e *tir* (*translocated intimin receptor*), os quais codificam, respectivamente, uma proteína de membrana externa de 94-kDA denominada intimina (JERSE *et al.*, 1990) e seu receptor Tir, que é translocado para a célula epitelial (KENNY *et al.*, 1997). Baseado nas variações antigênicas da porção C-terminal da molécula de intimina, muitos diferentes tipos e subtipos desta proteína têm sido descritos em EPEC e EHEC (BLANCO *et al.*, 2006; HORCAJO *et al.*, 2011).

O modelo para a patogênese de EPEC indica que a bactéria inicialmente adere às células epiteliais, sendo este um processo ainda não totalmente estabelecido e, possivelmente, multifatorial, uma vez que tem sido proposta a contribuição de diferentes adesinas na aderência inicial deste patotipo (NOUGAYRÈDE; FERNANDES; DONNENBERG, 2003; BARDIAU; SZALO, MAINIL, 2010). Após a adesão inicial, ocorre a montagem do T3SS e várias proteínas efetoras incluindo Tir, são translocadas para o interior da célula hospedeira. EPEC então se liga à célula hospedeira através da interação da intimina com Tir inserido na membrana, e numerosas proteínas do citoesqueleto acumulam-se sob o local onde a bactéria está ligada. As proteínas translocadas ativam vias de transdução de sinal nas células eucarióticas, e a diarreia provavelmente resulta de múltiplos mecanismos, incluindo a secreção ativa de íons, permeabilidade aumentada e perda da superfície absorptiva resultante da destruição das microvilosidades (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Em 1995, EPEC foram divididas em EPEC típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). Esta classificação é baseada na presença do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) em tEPEC e sua ausência em aEPEC (KAPER, 1996). O plasmídeo EAF (pEAF) contém os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), além da sequência genética referente ao fragmento sonda EAF e do operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica genes reguladores de fatores de virulência de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Cepas de tEPEC pertencem principalmente aos sorogrupos clássicos e expressam basicamente os genes contidos em LEE e pEAF (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Já aEPEC constitui um grupo bastante heterogêneo, com mais de 200 sorotipos descritos, muitos dos quais não pertencentes aos sorogrupos clássicos, além de frequentemente albergar genes de virulência associados a outras classes de *E. coli* patogênicas (HERNANDES *et al.*, 2009). Além disso, tEPEC e aEPEC também diferem quanto ao padrão de adesão a células epiteliais: tEPEC mostram apenas o padrão de adesão localizada (LA), enquanto que aEPEC podem apresentar, além de LA, o padrão de adesão localizada-like (LAL), adesão difusa (DA), adesão agregativa (AA), além de padrões de adesão não definidos (UND) e amostras não aderentes (NA) (ABE *et al.*, 2009).

Muitos estudos têm verificado que tEPEC são raramente isoladas de animais, sugerindo que os humanos sejam o único reservatório deste patótipo (TRABULSI; KELLER; CAMPOS, 2002). Em contraste, aEPEC tem sido isolada de humanos e também de diferentes espécies de animais (KRAUSE; ZIMMERMANN; BEUTIN, 2005). Além disso, alguns estudos sugerem que possa ocorrer a transmissão de cepas de aEPEC entre humanos e animais, evidenciando um possível potencial zoonótico deste patótipo (MOURA *et al.*, 2009; HORCAJO *et al.*, 2011).

Durante muitos anos, tEPEC foram associadas principalmente como causa de diarreia aguda em crianças com menos de um ano de idade nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). No entanto, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado uma acentuada redução nos números de casos por tEPEC, contrastando com o aumento significativo na prevalência de aEPEC em países industrializados (AFSET *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004; KOZUB-WITKOWSKI *et al.*, 2008) e em desenvolvimento, incluindo o Brasil (GOMES *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2007; ESTRADA-GARCIA *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2012). Surtos de diarreia devido a aEPEC também foram relatados na Finlândia (VILJANEN *et al.*, 1990), Estados Unidos (HEDBERG *et al.*, 1997) e Japão (YATSUYANAGI *et al.*, 2003). Estes estudos evidenciam a emergência de aEPEC como um importante patógeno associado com diarreia aguda e persistente, tanto em crianças como adultos em várias regiões do mundo.

2.3. *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)

STEC é caracterizada por sua habilidade em produzir pelo menos um membro de uma classe de potentes citotoxinas que inibem a síntese proteica em células eucarióticas. Estas toxinas foram inicialmente denominadas verotoxinas (VT) devido à sua atividade em cultura de células Vero (KONOWALCHUK; SPEIRS; STRAVIC, 1977). Após a identificação de similaridades com a toxina de *Shigella dysenteriae* (O'BRIEN *et al.*, 2002; 2003), a nomenclatura toxinas Shiga (Stx) passou a ser empregada, embora ambos os termos, VTEC e STEC ainda sejam aceitos.

Apesar dos relatos sobre a ocorrência de *E. coli* produtoras de Stx desde a década de 70, somente a partir da descrição de dois surtos de colite hemorrágica (CH), ocorridos nos Estados Unidos, em 1982 (RILEY *et al.*, 1983; KARMALI *et al.*, 1983), estes patógenos passaram a despertar o interesse dos pesquisadores. Desde então, STEC é considerado um patógeno emergente de grande relevância em termos de saúde pública, sendo responsável por vários surtos associados ao consumo de alimentos e água contaminados (NATARO; KAPER, 1998).

As infecções por STEC podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas, como a diarreia, colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), esta última definida pela tríade anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda (EKLUND *et al.*, 2002).

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) compreende um subgrupo de STEC que inclui cepas altamente patogênicas e de grande relevância clínico-epidemiológica, uma vez que o inóculo de apenas 10 bactérias é suficiente para causar doença em seres humanos (GRIFFIN; TAUXE, 1991). Além disso, cerca de 2 a 7% dos pacientes que apresentam diarreia ocasionada por cepas EHEC apresentam SHU (TARR; GORDON; CHANDLER, 2005).

Mais de 400 sorotipos de STEC foram descritos, muitos dos quais associados a doenças em humanos (<http://www.usc.es/ecoli/SEROTIPOSHUM.htm>). Além de O157:H7, outros sorotipos são frequentemente associados com os casos mais graves, tais como O26:H11 (H-), O91:H21 (H-), O103:H2, O111:H8 (H-), O113:H21, O117:H7, O118:H16, O121:H19, O128:H2 (H-), O145:H28 (H-) e O146:H21.

No Brasil, a incidência de infecções gastrointestinais devido à STEC é relativamente baixa. No entanto, casos esporádicos de diarreia, CH e SHU associados à STEC têm sido descritos (GUTH *et al.* 2002, 2005; IRINO *et al.* 2002, 2007; VAZ *et al.* 2004; DE TONI *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011). Em contraste, o país vizinho Argentina tem a maior incidência de SHU no mundo (LOPEZ *et al.*, 1998).

O mecanismo de patogenicidade de STEC é complexo e envolve vários fatores de virulência. No entanto, o principal componente de virulência desse grupo é a produção de um ou ambos os tipos de toxinas Shiga (Stx1 e Stx2) (CAPRIOLI *et al.*, 2005).

As toxinas Shiga pertencem ao grupo das toxinas tipo A/B, consistindo de uma subunidade A, enzimaticamente ativa e cinco subunidades B, responsáveis pela ligação a um receptor glicolipídico (Gb3), localizado na superfície da célula hospedeira. Após a internalização da toxina, as cadeias A e B se dissociam e a cadeia A inibe a síntese protéica pela inativação da subunidade ribossomal 60S da célula hospedeira (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998).

Os genes *stx*₁ e *stx*₂ estão localizados em genomas de fagos que se integram ao cromossomo da célula hospedeira (GOBIUS *et al.*, 2003). A presença destes genes em fagos proporciona sua disseminação entre diferentes cepas, assim como possibilita a sua coexistência em uma mesma bactéria. Assim, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente (FÜRST *et al.*, 2000).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que antibióticos que interferem na duplicação do DNA bacteriano, tais como a ciprofloxacina, ativam a resposta SOS e induzem o bacteriófago a uma maior produção da toxina, promovendo assim uma maior circulação da toxina nos pacientes, aumentando consequentemente o risco em desenvolver complicações extraintestinais (KIMMITT; HARWOOD; BARER, 2000; BIELASZEWSKA *et al.*, 2012). Devido a isso, na maioria dos casos, a terapia com antibióticos não é recomendada em infecções por STEC (WONG *et al.*, 2000).

Stx1 compreende um grupo homólogo com poucas variantes descritas, destacando-se Stx1c e Stx1d. Já o grupo das toxinas Stx2, que compartilha 55% da sequência de aminoácidos com Stx1, é bastante heterogêneo e inclui um grande número de variantes, as quais diferem entre si em relação às características antigênicas e toxicidade (MAINIL; DAUBE, 2005). Além da variante Stx2, estão incluídas neste grupo Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g (SCHEUTZ *et al.*, 2001; LEUNG *et al.*, 2003).

A subtipagem dos genes *stx* é útil para propósitos epidemiológicos e para estimar o potencial de patogenicidade de um isolado. STEC isoladas de ovinos geralmente possuem os genes *stx1c* (BRETT *et al.*, 2003) e *stx2b* (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001). Já os subtipos Stx2, Stx2c e Stx2d são mais frequentemente associados com desenvolvimento de SHU (FRIEDRICH *et al.* 2002; EKLUND *et al.* 2002).

Além da produção de Stx, cepas EHEC também contêm a região LEE e, consequentemente, o gene *eae* que codifica a intimina, podendo dessa forma

formar lesões A/E no epitélio intestinal (PATON; PATON, 1998). As complicações mais graves da infecção por STEC, como CH e SHU, estão intimamente associadas com amostras que albergam o gene *eae* (ETHELBERG *et al.*, 2004).

Embora as EHEC compartilhem com EPEC a habilidade em formar lesões A/E, há diferenças entre esses patótipos quanto aos mecanismos moleculares que levam à polimerização da actina e formação dos pedestais (FRANKEL; PHILLIPS, 2008). Em EPEC, após a translocação Tir é fosforilada no resíduo de tirosina 474, fato crucial para promover a polimerização dos filamentos de actina (KENNY, 1999; CAMPELLONE; LEONG, 2005). Diferentemente, a proteína Tir de EHEC não apresenta o resíduo de tirosina 474 e, portanto, não é fosforilada, sendo necessário a utilização da proteína efetora EspFu (CAMPELLONE *et al.*, 2004), também conhecida como TccP/TccP2 (*Tir cytoskeleton coupling protein*) (GARMENDIA *et al.*, 2004; WHALE *et al.*, 2007) para a formação do pedestal na infecção por esse patótipo. Os genes *tccp* e *tccp2* estão localizados em profagos inseridos no cromossomo bacteriano fora da região LEE. Estes genes têm sido detectados, além de EHEC, em linhagens de aEPEC, indicando que algumas amostras podem utilizar ambas as vias (WHALE *et al.*, 2007). Além disso, uma terceira via ainda não totalmente caracterizada tem sido descrito em aEPEC (BAI *et al.*, 2008).

Ao contrário da toxina Stx e da intimina, que desempenham papel importante na patogênese das infecções por STEC, vários fatores de virulência, codificados por genes presentes em plasmídios ou ilhas de patogenicidade têm sido descritos, embora o papel destes na doença ainda não esteja totalmente estabelecido (GYLES, 2007).

Um grande número de cepas STEC é capaz de produzir a enterohemolisina (Ehly), uma toxina formadora de poros pertencente à família das toxinas RTX. A expressão do fenótipo enterohemolítico é caracterizada pela formação de um pequeno halo turvo de hemólise ao redor do crescimento bacteriano, detectado somente na fase estacionária de crescimento em ágar sangue preparado com eritrócitos de carneiro lavados e acrescido de cloreto de cálcio (BEUTIN *et al.*, 1989). O gene que codifica a enterohemolisina (*ehxA*) está contido em um plasmídio de virulência de 90 kb (pO157), comum em cepas O157 e em outros sorotipos de STEC (BRUNDER *et al.*, 1999). A produção de enterohemolisina também tem sido associada com doenças de maior severidade, mas a maneira

como contribui para a patogênese de STEC ainda não é bem compreendida. Uma possibilidade é que a liberação da hemoglobina, devido à lise dos eritrócitos, sirva como fonte de ferro estimulando o crescimento do microrganismo (LAW; KELLY, 1995).

Uma adesina autoaglutinante denominada Saa (*STEC autoagglutinating adhesin*), foi inicialmente caracterizada em um cepa do sorotipo O113:H21, responsável por um surto de SHU (PATON *et al.*, 2001). Estes autores sugeriram que o gene *saa* encontra-se no mesmo megaplasma que codifica a enterohemolisina de STEC. A eliminação deste megaplasma resultou na redução da capacidade de aderência da bactéria ao intestino do hospedeiro (JENKINS *et al.*, 2003). Além do sorotipo O113:H21, o gene *saa* foi detectado em outras cepas STEC isoladas de casos esporádicos de SHU, o que sugere que Saa possa ser um fator de virulência em cepas de STEC LEE-negativas isoladas de humanos (PATON; PATON, 2002).

Os produtos do operon *lpfABCDE* estão associados com a expressão de fímbrias, dentre as quais *Long Polar Fimbriae* (LPF). Os genes *lpf*, identificados inicialmente no sorotipo O113:H21 de STEC, e posteriormente em outras cepas LEE-positivas e negativas, possivelmente estão implicados no mecanismo de adesão de STEC (TORRES *et al.* 2002). A deleção destes genes resultou na redução da virulência da cepa de STEC O113:H21 (DOUGHTY *et al.* 2002).

Tarr *et al.* (2000) descreveram Iha (*IrgA homologue adhesin*), uma proteína de membrana externa de 67 kDa, que está amplamente presente tanto em STEC LEE-positivas quanto em LEE-negativas e que pode contribuir para a adesão destas amostras.

Bielaszewska *et al.* (2005) demonstrou que CDT-V, um novo membro da família das toxinas citotéticas distensoras (CDT), foi capaz de causar danos irreversíveis à células epiteliais endoteliais, sugerindo que esta toxina possa contribuir em infecções mediadas por STEC.

A citotoxina subtilase (SubAB), um novo membro da família das toxinas A/B₅, tem sido identificada em cepas de STEC LEE-negativas (PATON *et al.*, 2004). Esta toxina demonstrou citotoxicidade em células Vero e foi letal a camundongos, induzindo lesões semelhantes àsquelas observadas em casos de SHU, o que indica que SubAB possa contribuir para a patogênese em STEC.

Os ruminantes domésticos, especialmente bovinos e ovinos, são considerados o principal reservatório natural de STEC (BEUTIN *et al.*, 1993). Estes animais geralmente permanecem saudáveis (assintomáticos) à colonização por STEC, aparentemente devido à falta de receptores Gb3 no trato intestinal e sistema vascular (PRUIMBOOM-BREES *et al.* 2000).

STEC pode potencialmente contaminar alimentos de origem animal, sendo que a forma mais comum é a contaminação de carne com conteúdo fecal e intestinal após o abate (MENG; DOYLE. 1998; BARLOW *et al.*, 2006) Em consequência disso, o consumo de produtos cárneos crus ou mal cozidos, como hambúrgueres e carne moída, está fortemente associado ao desenvolvimento de infecções em humanos (GRIFFIN; TAUXE, 1991; RANGEL *et al.*, 2005). Outros alimentos, como produtos de laticínios crus ou inadequadamente pasteurizados e produtos cárneos, secos ou fermentados tais como salame e defumados, também podem estar contaminados com STEC e, dessa forma, servir como fonte de infecções para humanos (HUSSEIN; SAKUMA, 2005; HUSSEIN, 2007).

No entanto, muitos surtos ocasionados por STEC, inclusive SHU, foram descritos associados ao consumo de outros tipos de alimentos, como alface, suco de maçã não pasteurizado, broto de alfafa, espinafre, broto de rabanete, assim como água (RANGEL *et al.*, 2005), indicando que a contaminação do ambiente com as fezes destes animais também é um fator relevante na transmissão de STEC.

2.4. OVINOS COMO RESERVATÓRIOS DE STEC E AEPEC

Mais de 50 sorogrupos e 100 sorotipos têm sido descritos em STEC isoladas de ovinos, muitos dos quais associados com doenças severas em humanos (<http://www.usc.es/ecoli/SEROTIPOSIVI.htm>).

Nas últimas décadas, diversos estudos conduzidos em várias regiões do mundo têm reportado diferentes prevalências de STEC em ovinos, com taxas variando de 50% a 100% nas propriedades e 13% a 100% dos animais (**Tabela 1**).

STEC também têm sido detectadas em abatedouros (OSÉS *et al.*, 2010), carcaças (TAHAMTAN; HAYATI; MEHDI NAMAVARI, 2010) e alimentos derivados de ovinos, como carne (BROOKS *et al.*, 2001; BENNETT; BETTELHEIM,

2002; YADAV *et al.*, 2007), leite e produtos lácteos (REY *et al.*, 2006; CARO; MATEO; GARCÍA-ARMESTO, 2007; STEPHAN *et al.*, 2008; ZWEIFEL *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Prevalências de STEC em ovinos em diferentes regiões do mundo.

Localidade	% animais STEC positivos	Referências
Alemanha	66,6	BEUTIN <i>et al.</i> , 1993
Alemanha	88,0	BEUTIN <i>et al.</i> , 1997
Austrália	69,0	SIDJABAT-TAMBUNAN; BENSINK, 1997
Austrália	83,3	FEGAN; DESMARCHELIER, 1999
Estados Unidos	56,0	McCLUSKEY <i>et al.</i> , 1999
Alemanha	32,1	ZSCHÖCK <i>et al.</i> , 2000
Austrália	45,0	BETTELHEIM; BENSINK; TAMBUNAN,, 2000
Austrália	67,0	DJORDJEVIC <i>et al.</i> , 2001
Taiwan	16,0	CHIUEH; LIU; SHIH, 2002
Brasil	52,0	VETTORATO <i>et al.</i> , 2003
Espanha	36,0	BLANCO <i>et al.</i> , 2003
Espanha	35,0	REY <i>et al.</i> , 2003
Espanha	24,4	ORDEN <i>et al.</i> , 2003
Estados Unidos	30,0	HUSSEIN; THRAN; GLIMP, 2003
Noruega	87,6	URDAHL <i>et al.</i> , 2003
Austrália	40,0	DJORDJEVIC <i>et al.</i> , 2004
Suíça	29,9	ZWEIFEL <i>et al.</i> , 2004
Jordânia	34,8	NOVOTNA <i>et al.</i> , 2005
Sérvia	66,8	COBELJIC <i>et al.</i> , 2005
Nova Zelândia	65,9	COOKSON <i>et al.</i> , 2006
Espanha	80,8	SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2010
Índia	34,6	KIRANMAYI <i>et al.</i> , 2011
Irã	13,0	GHANBARPOUR; KIANI, 2011
Alemanha	100,0	SCHILLING <i>et al.</i> , 2012
México	18,0	AMÉSQUITA-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2012

Embora o gado bovino seja considerado o principal reservatório de STEC, maiores prevalências têm sido descritas em ovinos (BEUTIN *et al.*, 1993; ZSCHÖCK *et al.*, 2000; URDAHL *et al.*, 2003; COBELJIC *et al.*, 2005; AMÉSQUITA-LÓPEZ *et al.*, 2012). Além disso, estudos envolvendo a pesquisa de STEC em carnes cruas de bovinos e ovinos resultaram em maior detecção tanto de STEC O157 (CHAPMAN *et al.*, 2001) quanto não-O157 (BARLOW *et al.*, 2006) em amostras ovinas, sugerindo que talvez nestes animais a contaminação da carne crua com o material fecal durante o processamento seja facilitada.

A importância dos ovinos como fontes de infecção a humanos também tem sido evidenciada pela descrição de surtos de diarreia e SHU ocorridos na França (ESPIÉ *et al.*, 2006) e Noruega (SCHIMMER *et al.*, 2008) associados ao consumo de carne ovina. São ainda documentados casos de SHU associados ao

consumo de água contaminada com fezes destes animais (LICENCE *et al.*, 2001) e também através do contato direto com estes (WARSHAWSKY *et al.*, 2002).

O número de estudos investigando a ocorrência de aEPEC em ovinos é mais limitado quando comparado à STEC. Além disso, a maior parte destas aEPEC têm sido isoladas durante a investigação nestes animais de *E. coli* causadoras de lesão A/E (AEEC) (AKTAN *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2005; FRÖHLICHER *et al.*, 2008; YUSTE *et al.*, 2008). Dois estudos recentes conduzidos na Noruega sugerem que ovinos sejam um importante reservatório naquele país de aEPEC O26:H11, um dos principais sorotipos associados em doenças em humanos (BRANDAL *et al.*, 2012; SEKSE *et al.*, 2012).

A infecção experimental de ovinos com *E. coli* O157:H7 resultou em uma eficiente colonização do trato intestinal com um grande número de bactérias sendo eliminadas nas fezes destes animais, (WALES *et al.*, 2005). Interessantemente, estes animais apresentaram lesões A/E em seus epitélios intestinais, porém mantiveram-se assintomáticos. Também de interesse foi a detecção de cepas aEPEC O115, além da amostra teste O157:H7, indicando que algumas das lesões A/E observadas ocorreram de forma natural. Estes resultados sugerem que a intimina e demais genes da região LEE podem desempenhar um importante papel na colonização do trato gastrintestinal de ovinos por EHEC e aEPEC (LA RAGIONE *et al.*, 2009).

No Brasil, aEPEC e STEC foram detectadas em amostras fecais de ovinos saudáveis no Estado de São Paulo (VETTORATO *et al.*, 2003; 2009). Neste mesmo estado, Rigobelo *et al.* (2008) examinando carcaças de ovinos identificaram os genes *stx2* em 2,58% das amostras.

Apesar destes relatos, os ovinos ainda são menos estudados do que os bovinos no Brasil, não se sabendo o quanto que esses animais contribuem para as infecções em humanos no país. Diante disso, surgiu a necessidade deste estudo, em que foi investigada a ocorrência e características de virulência de STEC e EPEC isoladas de ovinos no Estado do Paraná, região na qual esses dados eram inexistentes até o momento.

REFERÊNCIAS

- ABE, C. M.; BLANCO, M.; DHABI, G.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; PIAZZA, R. M. F.; MARTINEZ, M. B.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*(+) EAFnegative *stx*(-) genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.
- AKTAN, I., SPRIGINGS, K.A., LA RAGIONE, R.M., FAULKNER, L.M., PAIBA, G.A., WOODWARD, M.J. Characterization of attaching–effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 43– 53, 2004.
- AMÉSQUITA-LÓPEZ, B. A.; QUIÑONES, B.; COOLEY, M. B.; LEÓN-FÉLIX, J.; CASTRO-DEL-CAMPO, N.; MANDRELL, R. E.; CHAIDEZ, C. Genotypic analyses of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. **Plos One**, v. 7, e51565, 2012.
- ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.
- BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, N. A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J. B.; GOMES, T. A. T.; XU, J.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 361-368, 2008.
- BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Veterinary Research**. v. 41:57, 2010.
- BARLOW, R. S.; GOBIUS, K. S.; DESMARCHELIER, P. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 1-5, 2006.
- BENNETT, J.; BETTELHEIM, K. A. Serotypes of non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from meat in New Zealand. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, p. 77-84, 2002.
- BETTELHEIM, K. A.; BENSINK, J. C.; TAMBUNAN, H. S. Serotypes of verotoxin-producing (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli* isolated from healthy sheep. **Comparative, Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 1-7, 2000.

- BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN R. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2559-2564, 1989.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, p. 2483-2488, 1993.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; ALEKSIC, S.; GILLESPIE, H. A.; WHITTAM, T. S. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2175-2180, 1997.
- BIELASZEWSKA, M.; SINHA, B.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 552-562, 2005.
- BIELASZEWSKA, M.; IDELEVICH, E. A.; ZHANG, W.; BAUWENS, A.; SCHAUMBURG, F.; MELLMANN, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 3277-3282, 2012.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M.P.; DAHBI, G.; GONZÁLEZ, E.A.; Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1351-1356, 2003.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; COIRA, M.A.; MADRID, C.; JUÁREZ, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **International Microbiology**, v. 9, p.103–110, 2006.
- BRANDAL, L.T.; SEKSE, C.; LINDSTEDT, B. A.; SUNDE, M.; LABERSLI, L.; URDAHL, A. M.; KAPPERUD, G. Norwegian sheep are an important reservoir for human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4083-4091, 2012.
- BRETT, K. N.; RAMACHANDRAN, V.; HORNITZKY, M. A.; BETTELHEIM, K.A.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. *stx1c* is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep but not among isolated from cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 926-936, 2003.
- BROOKS, H. J.; MOLLISON, B. D.; BETTELHEIM, K. A.; MATEJKA, K.; PATERSON, K. A.; WARD, V. K. Occurrence and virulence factors of non-O157

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 118-122, 2001.

BRÜNDER, W.; SCHMIDT, H.; FROSCH, M.; KARCH, H. The large plasmid of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. **Microbiology**, v. 145, p. 1005-1014, 1999.

CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, R.; LEONG, J. M. EspFu is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N/WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Developmental Cell**, v. 7, p. 217-228, 2004.

CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 416-432, 2005.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, p. 289-311, 2005.

CARO, I.; MATEO, J.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. Phenotypical characteristics of Shiga-like toxin *Escherichia coli* isolated from sheep dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 295-300, 2007.

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

CHIUEH, L. C.; LIU, F. M.; SHIH, D. Y. C. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feces and raw milk of domestic cattle and sheep. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 39-46, 2002.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

COBELJIC, M.; DIMIC, B.; OPACIC, D.; LEPSANOVIC, Z.; STOJANOVIC, V.; LAZIC, S. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 359-366, 2005.

COOKSON, A. L.; TAYLOR, S. C.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G. T. Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 78-84, 2006.

DE TONI, F.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KLASSEN, G.; IRINO, K.; UM RIGO, L.; STEFFENS, M. B.; FIALHO, O. B.; FARAH, S. M.; FADEL-PICHETH, C. M. A prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Paraná State, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 645-647, 2009.

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

DJORDJEVIC, S. P.; RAMACHANDRAN, V.; BETTELHEIM, K. A.; VANSELOW, B. A.; HOLST, P.; BAILEY, G.; HORNITZKY, M. A. Serotypes and virulence gene profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3910–3917, 2004.

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

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying genes: *stx* and *stx*-positive virulence profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4585-4593, 2002.

ESPIE, E.; GRIMONT, F.; VAILLANT, V.; MONTET, M. P.; CARLE, I.; BAVAI, C.; DE VALK, H.; VERNOSY-ROZAND, C. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 992–998, 2006.

ESTRADA-GARCIA, T.; LOPEZ-SAUCEDO, C.; THOMPSON-BONILLA, R.; ABONCE, M.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; SANTOS, J. I.; ROSADO, J. L.; DUPONT, H. L.; LONG, K. Z. 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**, v. 47, p. 93-98, 2009.

ETHELBERG, S., K. E. OLSEN, F. SCHEUTZ, C. JENSEN, P. SCHIELLERUP, J. ENBERG, A. M. PETERSEN, B. OLESEN, P. GERNER-SMIDT, AND K. MOLBAK. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 842–847, 2004.

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

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 549-556, 2008.

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

- FRÖHLICHER, E.; KRAUSE, G.; ZWEIFEL, C.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. **BMC Microbiology**, v. 8, p.144, 2008.
- FÜRST, S.; SCHEEF, J.; BIELASZEWSKA, M. RÜSSMAN, H.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. Identification and Characterization of *Escherichia coli* strains O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 383-386, 2000.
- GARMENDIA, J.; PHILLIPS, A.; CHONG, Y.; SHULLER, S.; MARCHES, O.; DAHAN, S.; OSWALD, E.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. TccP is enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 1167-1183, 2004.
- GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2573-2585, 2005.
- GHANBARPOUR, R.; KIANI, M. Characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from healthy fat-tailed sheep in southeastern of Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, p. 641-648, 2011.
- GOBIUS, K. S.; HIGGS, G. M.; DESMARCHELIER, P. M. Presence of activatable Shiga toxin genotype (*stx2d*) in Shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3777-3783, 2003.
- GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerging Infectious Disease**, v. 10, p. 1851–1855, 2004.
- GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, p. 60-98, 1991.
- GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 535-536, 2002.
- GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; GOMES, T.A.T.; CHINARELLI, S.H.; ROCHA, M.M.M.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; IRINO, K. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 805-806, 2005.
- GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. E45–62, 2007.
- HEDBERG, C. W.; SAVARINO, S. J.; BESSER, J. M.; PAULUS, C. J.; THELEF, V. M.; MYERS, L. J.; CAMERON, D. N.; BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; OSTERHOLM, M. T. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39: NM: an agent that does not fit into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 1625-1628, 1997.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIERA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, p. 137-149, 2009.

HORCAJO, P.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; PUENTES, B.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.; ORDEN, J.A. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. **Veterinary Microbiology**, v. 155, p. 341-348, 2011.

HUSSEIN, H. S.; THRAN, B. H.; GLIMP, H. A. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in sheep grazing an irrigated pasture or arid rangeland forages. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p. 4358-4364, 2003.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 450-465, 2005.

HUSSEIN, H. S. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. E63-E72, 2007.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M. A. M. F.; NAVES, Z. V. F.; LARA, R. R.; MARCO, M. E. C.; ROCHA, M. M. M.; MOREIRA, T. P.; GOMES, T. A. T.; GUTH, B. E. C. O157: H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 446-447, 2002.

IRINO, K.; VAZ, T. M.; MEDEIROS, M. I.; KATO, M. A.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; GUTH, B. E. Serotype diversity as drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 565-567, 2007.

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

JENKINS, C.; PERRY, N. T.; CHEASTY, T.; SHAW, D. J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G. J.; SMITH, H. R.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1775-1778, 2003.

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

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

KARMALI, M. A.; PETRIC, C.; LIM, P. C.; FLEMING, P. C.; STEELE, B. T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. **Lancet**, v. 3, p. 1299-1300, 1983.

- KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511-520, 1997.
- KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 1229-1241, 1999.
- KIMMITT, P. T.; HARWOOD, C. R.; BARER, M. R. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. **Emerging Infectious Disease**, v.6, p.458-465, 2000.
- KIRANMAYI, C. B.; KRISHNAIAH, N.; SUBHASHINI, N.; MAHESWARI, M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from faeces and farm water samples of sheep using PCR. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 383-389, 2011.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 775-779, 1977.
- KOZUB-WITKOWSKI, E.; KRAUSE, G.; FRANKEL, G.; KRAMER, D.; APPEL, B.; BEUTIN, L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 403-410, 2008.
- KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiololy**, v. 106, p. 87-95, 2005.
- LA RAGIONE, R. M.; BEST, A.; WOODWARD, M. J.; WALES, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 394-410, 2009.
- LAW, D.; KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga like toxin producing *E. coli* serogroups. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 700-702, 1995.
- LEUNG, P. H.; PEIRIS, J. S.; NG, W. W.; ROBINS-BROWNE, R. M.; BETTELHEIM, K. A.; YAM, W. C. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7549-7553, 2003.
- LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, p. 1119-1122, 1978.
- LICENCE, K.; OATES, K.R.; SYNGE, B.A.; REID, T.M. An outbreak of *E.coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 135-138, 2001.

- LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; DE ROSA, M. F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in South America. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 30-37.
- MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1332-1344, 2005.
- MCCLUSKEY, B. J.; RICE, D. H.; HANCOCK, D. D.; HOVDE, C. J.; BESSER, T. E.; GRAY, S.; JOHNSON, R. P. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli* in lambs at slaughter. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 563-565, 1999.
- MCDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.
- MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN, A.D. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals, In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 121-128.
- MENG, J. ZHAO, S.; DOYLE, M. P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 229-235, 1998.
- MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines **Infection and Immunity**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.
- MORENO, A. C.; FILHO, A. F.; GOMES, T. D.; RAMOS, S. T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. D.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 50 – 57, 2010.
- MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7399-7408. 2009.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.
- NETER, E.; WESTPHAL, O.; LÜDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801-808, 1955.
- NOUGAYRÈDE, J. P.; FERNANDES, P. J.; DONNENBERG, M. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cellular Microbiology** v. 5, p. 359-372, 2003.

- NOVOTNA, R.; ALEXA, P.; HAMRIK, J.; MADANAT, A.; SMOLA, J.; CIZEK, A. Isolation and characterization Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157:H7. **Veterinarni Medicina**, v. 50, p. 111–118, 2005.
- NUNES, M. R.; MAGALHÃES, P. P.; MACÊDO, A. S.; FRANCO, R.T.; PENNA, F. J.; MENDES, E. N. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 43-47, 2012.
- O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 146, p. 763-769, 1982.
- O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W.; FORMAL, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with hemorrhagic colits in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**, v. 2, p. 702, 1983.
- ORDEN, J. A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; CID, D.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J.; DE LA FUENTE, R. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 313-321, 2003.
- OSÉS, S. M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Prevalence and quantification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* along the lamb food chain by quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S163–S169, 2010.
- PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 450-479, 1998.
- PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 271-274, 2002.
- PATON, A. W.; SRINAMOTE, P.; TALBOR, U. M.; WANG, H.; PATON, J. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shigatoxigenic *Escherichia coli*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 35-46, 2004.
- PRUIMBOOM-BREES, I. M.; MORGAN, T. W.; ACKERMANN, M. R.; NYSTROM, E. D.; SAMUEL, J. E.; CORNICK, N. A.; MOON, H. W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 10325-10329, 2000.

RAMACHANDRAN, V.; HORNITZKY, M. A.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, 1932-1937, 2001.

RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 603-609, 2005.

REY, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; USERA, M. A.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 47-56, 2003.

REY, J.; SÁNCHEZ, S.; BLANCO, J. E. *et al.* Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 212-217. 2006.

RIGOBELLO, E. C.; TAKAHASHI, L. S.; NICODEMO, D.; ÁVILA, F. A.; MALUTA, R. P.; RUIZ, O. S.; STELLA, A. E. Virulência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, p. 475-482, 2008.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 681-685, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, T. M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging and Infectious Diseases**, v. 10, p. 1797–1805, 2004.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, A.; BENÍTEZ, J. M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; MORA, A.; ALONSO, J. M.; REY, J. Variation in the prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in four sheep flocks during a 12-month longitudinal Study. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 144–148, 2010.

SCHEUTZ, F.; BEUTIN, L.; PIERARD, D.; SMITH, H. Nomenclature of verotoxins. In **Verocytotoxigenic *E. coli*** ed. DUFFY, G., GARVEY, P.; MCDOWELL, D.A. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2001, p. 447–452.

SCHILLING, A. K.; HOTZEL, H.; METHNER, U.; SPRAGUE, L.D.; SCHMOOCK, G.; EL-ADAWY, H.; EHRICHT, R.; WORH, A. C.; ERHARD, M.; GEUE, L. Zoonotic agents in small ruminants kept on city farms in southern Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 3785-3793, 2012.

SCHIMMER, B.; NYGARD, K.; ERIKSEN, H. M. *et al.* Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 41-50, 2008.

SEKSE, C.; SUNDE, M.; LINDSTEDT, B. A.; HOPP, P.; BRUHEIM, T.; CUDJOE, K. S.; KVITILE, B.; URDAHL, A. M. Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 4949-4958, 2012.

SIDJABAT TAMBUNAN, H.; BENSINK, J.C. Verotoxin-producing *Escherichia coli* from the faeces of sheep, calves and pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p. 292-293, 1997.

SOUZA, R.L.; CARVALHAES, J.T.A.; NISHIMURA, L.S.; DE ANDRADE, M.C.; GUTH, B.E.C. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 76-82, 2011.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; DANUSER, J.; BEUTIN, L. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2561-5, 2008.

TAHAMTAN, Y.; HAYATI, M.; MEHDI NAMAVARI, M. Contamination of Sheep carcasses with verocytotoxin producing *Escherichia coli* during slaughtering. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p.25–27, 2010.

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

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

TORRES, A. G.; GIRON, J. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F. R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J. B. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5416-5427, 2002.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

URDHAL, A. M.; BEUTIN, L.; SKJERVE, E.; ZIMMERMANN, S.; WASTESON, Y. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm, **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.92-101, 2003.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, A. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence properties and

characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 903-905, 2004.

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

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

VILJANEN, M.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S.; OLKKONEN, L.; JARVINEN, H.; KUISTILA, M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v. 336, p. 381-384, 1990.

WALES, A. D.; PEARSON, G. R.; BEST, A.; COOKSON, A. L.; LA RAGIONE, R. M.; ROE, J. M.; HAYES, C. M.; WOODWART, M. J. Naturally acquired attaching and effacing *Escherichia coli* in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 109-115, 2005.

WARSHAWSKY, B.; GUTMANIS, I.; HENRY, B.; DOW, J.; REFFLE, J.; POLLETT, G.; AHMED, R.; ALDOM, J.; ALVES, D.; CHAGLA, A.; CIEBIN, B.; KOLBE, F.; JAMIESON, F.; RODGERS, F. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 related to animal contact at a petting zoo. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 175-181, 2002.

WHALE, A. D.; HERNANDES, R. T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHÜLLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIERA, M. A. M.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A. D.; GOMES, T. A. T.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2- a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 153, p. 1743-1755, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Programme for control of diarrheal diseases (CDD/83.3 Rev 1). Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva, 1987.

WONG, C. S.; JELACIC, S.; HABEEB, R.L.; WATKINS, S.L.; TARR, P.I. The risk of the hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 1930–1936, 2000.

YADAV, M. M.; ROY, A.; SHARDA, R.; ARYA, G. Detection of toxin genes and antibiogram pattern in *Escherichia coli* isolates from sheep meat on Indian market. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, n. 6, p. 485-494, 2007.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, p. 2033-2039, 2003.

YUSTE, M.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; CID, D.; MARTÍNEZ-PUGARIN, S.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G. Polymerase chain reaction typing of genes of the locus of enterocyte effacement of ruminant attaching and effacing *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v, 72, p. 444-448, 2008.

ZSCHÖCK, M.; HAMANN, H. P.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats; prevalence and virulence properties. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p. 203-208, 2000.

ZWEIFEL, C., ZYCHOWSKA, M. A.; STEPHAN, R., Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 45 – 53, 2004.

ZWEIFEL, C.; GIEZENDANNER, N.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; BEUTIN, L.; DANUSER, J.; STEPHAN, R. Characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 88-91, 2010.

3. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Investigar a prevalência de STEC e EPEC em ovinos sem diarreia e caracterizar genotípica e fenotipicamente os isolados, além de comparar os perfis de virulência obtidos com aqueles associados a doenças em humanos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de STEC, tEPEC e aEPEC através da detecção dos genes marcadores de virulência *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *bfpA* por PCR;
- Investigar a presença de genes adicionais de virulência associados a toxinas (*ehxA*, *cdtV* e *subAB*) e adesinas (*saa*, *lpf*_{O113} e *iha*);
- Determinar os subtipos de intimina e dos genes *stx*₂;
- Investigar em aEPEC a presença dos genes *tir* e *tccp/tccp2*, associados com o fenótipo A/E;
- Determinar os sorotipos O:H;
- Analisar as propriedades fenotípicas com relação à citotoxicidade (apenas STEC), produção de hemolisinas e adesão a células epiteliais;
- Classificar filogeneticamente os isolados com base nos grupos A, B1, B2 e D

4. TRABALHOS CIENTÍFICOS

*Artigo em elaboração que será submetido à revista *International Journal of Food Microbiology*

Prevalência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) isoladas de ovinos no Estado do Paraná

Fernando Henrique Martins^a, Roxane Maria Fontes Piazza^b, Beatriz Ernestina Cabilio Guth^c, Jorge Blanco^d, Jacinta Sanchez Pelayo^{a*}

^a Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa postal 10011, 86 057 – 970 Londrina, PR, Brasil

^b Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, 05503 – 900 São Paulo, SP, Brasil

^c Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Universidade Federal de São Paulo, 04023 – 062, São Paulo, SP, Brasil

^d Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Espanha

Correspondência: jspelayo@uel.br Fone: (+55 43) 3371 4494

Resumo

A prevalência, sorotipos e perfis de virulência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) foi investigada em 130 ovinos sem diarreia pertencentes a propriedades do Estado do Paraná. STEC foi detectada em 100% das propriedades e em 50% dos animais. Um total de 70 isolados STEC foi caracterizado neste estudo. Entre estes foram identificados 23 diferentes sorotipos, dos quais O76:H19, O65:H-, O75:H-, O91:H-, O75:H14 e O128:H2 foram os mais prevalentes. Dezesete sorotipos foram previamente encontrados em STEC isoladas de humanos, nove dos quais em associação com síndrome hemolítico-urêmica (SHU), como O5:H-, O91:H-, O103:H2 e O128:H2. Com relação aos genes *stx*, 37 (52.8%) apresentavam *stx1*, dez (14.3%) portavam *stx2* e 23 (32.9%) foram positivos para ambos, *stx1* e *stx2*. O subtipo *stx2b* foi o mais frequente, sendo também detectados *stx2c* e *stx2d*. Todos os isolados apresentaram atividade citotóxica em células Vero, sendo 50% destes altamente citotóxicos. Entre os quatro (5.7%) isolados positivos para *eae*, dois

apresentavam o subtipo $\epsilon 1$, um portava $\gamma 1$ e outro *eae*-ND (não determinado). O gene *ehxA* foi presente em 61 (87.1%) isolados, dos quais 42 expressaram a enterohemolisina (Ehly). Os genes que codificam adesinas, *saa*, *lpf*_{O113} e *iha*, foram identificados em 54,1%, 80,5% e 9,7% dos isolados. Já os genes de toxinas *subAB* e *cdtV* foram pouco frequentes. Todas STEC aderiram a células HEp-2, sendo diferentes padrões de adesão observados. Os isolados STEC pertenciam principalmente ao filogrupo B1 (90%). De um modo geral, um grande número de animais foi positivo para STEC, incluindo isolados com sorotipos e perfis de virulência associados a doenças em humanos. Isto sugere que ovinos podem ser importantes reservatórios de STEC patogênicas em nosso meio.

Palavras-chave: STEC, reservatório, ovinos, virulência.

1. Introdução

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) são patógenos entéricos zoonóticos, frequentemente associados a surtos alimentares em muitos países (Nataro e Kaper, 1998). A infecção por STEC pode resultar em um quadro assintomático ou de diarreia moderada até complicações mais graves, como colite hemorrágica (CH) e a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (Eklund et al., 2002).

Em muitos países, o sorotipo O157:H7 tem sido associado à maioria dos casos de doenças e surtos. No entanto, são descritos mais de 400 sorotipos de STEC, dos quais cerca de 150 implicados em doenças em humanos (<http://www.usc.es/ecoli/SEROTIPOSHUM.htm>). No Brasil, importantes sorotipos de STEC, como O157:H7, O26:H11, O111:H8 e O103:H2 têm sido associados a casos esporádicos de diarreia, CH e SHU (Guth et al., 2005; Irino et al., 2007; Souza et al., 2011).

A capacidade de STEC em causar doenças em humanos é associada principalmente à produção de um ou ambos os tipos de potentes citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx1 e Stx2), que inibem a síntese protéica na célula eucariótica (Caprioli et al., 2005). Stx1 compreende um grupo antigenicamente similar, diferentemente de Stx2, que apresenta sete subtipos descritos: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g (Scheutz and Strockbine, 2005).

Cepas de STEC associadas a infecções severas em humanos podem expressar além de Stx a proteína intimina, codificada pelo gene cromossomal *eae*, que está associada com a adesão íntima da bactéria ao enterócito (Paton e Paton, 1998a). Baseado no polimorfismo do gene *eae*, cerca de 34 tipos e subtipos de intimina têm sido descritos (Blanco et al., 2006; Horcajo et al., 2011). Outros fatores de virulência descritos em STEC compreendem a enterohemolisina (Ehly), codificada pelo gene *ehxA* (Schmidt et al., 1995); as adesinas Saa (*STEC autoagglutinating adhesin*) (Paton et al., 2001), Iha (*Irg homologous adhesin*) (Tarr et al., 2000) e Lpf (*Long polar fimbriae*) (Doughty et al., 2002), além de toxinas, como SubAB (*subtilase cytotoxin*) (Paton et al., 2004) e CDT-V (*cytolethal distending toxin*) (Cergole-Novella et al., 2007).

Animais de produção como bovinos e ovinos constituem o principal reservatório natural de STEC (Beutin et al., 1993), que podem ser transmitidas ao homem pela ingestão de alimentos contaminados (Martin e Beutin, 2011). A investigação da ocorrência deste patótipo no reservatório animal é de extrema importância epidemiológica, principalmente em se tratando do monitoramento de possíveis fontes de infecção.

No Brasil, em contraste aos muitos estudos em bovinos (Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Timm et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Pigatto et al., 2008), poucos têm reportado a ocorrência de STEC em ovinos (Vettorato et al., 2003; 2009), não sendo muito bem estabelecido o quanto estes animais podem contribuir para infecção por STEC em nosso meio. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar a prevalência de STEC em ovinos pertencentes a propriedades do Estado do Paraná e caracterizar os isolados com base em seus sorótipos e perfis de virulência.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras fecais

Dez propriedades que desenvolviam a criação de ovinos de corte em regime de confinamento ou semiconfinamento na região Norte do Estado do Paraná foram selecionadas para este estudo. Os animais eram todos aparentemente saudáveis (sem diarreia), pertencentes a diferentes raças, com uma semana a oito anos de idade. As propriedades foram visitadas uma única vez durante o período de abril a

setembro de 2010. Amostras fecais de 130 ovinos aleatoriamente selecionados, representando cerca de 10% do rebanho, foram coletadas por *swab* retal. As amostras foram transportadas até o laboratório em meio Cary-Blair (Difco) e processadas em no máximo 6 h após a coleta.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA nº 33/10; processo nº 10449.2010.10) da Universidade Estadual de Londrina.

2.2. *Cultivo e identificação bioquímica*

As amostras foram semeadas em ágar MacConkey (Difco) e incubadas a 37°C por 18 h. Em média três colônias presuntivas de *E. coli* foram selecionadas do crescimento bacteriano de cada placa e submetidas à identificação bioquímica utilizando-se os meios EPM (Toledo et al., 1982a), MILi (Toledo et al., 1982b) e Citrato de Simmons (Difco). Os isolados bioquimicamente identificados como *E. coli* foram armazenados em ágar estoque à temperatura ambiente e a -20°C em caldo infusão de coração e cérebro (BHI; Difco) com 20% (v/v) de glicerol.

2.3. *Deteção de STEC por PCR multiplex*

O DNA bacteriano foi obtido pelo método de extração por fervura segundo Blanco et al. (1997). Os isolados foram cultivados em ágar Lúria-Bertani (LB) por 18 h a 37°C. Uma alçada do crescimento bacteriano foi ressuspensa em 300 µL de água ultrapura estéril, submetida à fervura por 10 min, seguida por centrifugação a 10 000 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi utilizado nas reações em cadeia da polimerase multiplex (mPCR) para deteção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*, conforme descrito por Paton e Paton (1998b). Todos os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão listados na Tabela S1 (Material Suplementar).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), em um volume final de 25 µL, contendo 2 µL do lisado bacteriano, 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 25 pmol de cada iniciador (Invitrogen) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%

(Agargen), corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen) e visualizado com o auxílio de transiluminador Ultravioleta (UV) ECX-20.M (Vilbert Loumart).

2.4. Sorotipagem

A determinação dos antígenos O e H foi realizada de acordo com Guinée et al. (1981), utilizando todos os antissoros O (O1-O185) e H (H1-H56) disponíveis. Os antissoros O foram produzidos no Laboratório de Referência *Escherichia coli* (Universidade de Santiago de Compostela, Espanha) e os antissoros H foram adquiridos do *Staten Serum Institute* (Copenhague, Dinamarca). Os isolados que não reagiram com os antissoros O foram considerados não tipáveis (ONT) e, aqueles não móveis, H-.

2.5. Caracterização Genotípica de STEC

Os isolados STEC foram investigados quanto à presença dos genes *ehxA* (Paton e Paton, 1998b), *saa* (Paton e Paton, 2002), *lpf_{O113}* (Doughty et al., 2002), *iha* (Tarr et al., 2000), *subAB* (Paton et al., 2004) e *cdtV* (Cergole-Novella et al., 2007), conforme previamente descrito. A subtipagem dos genes *stx2* foi realizada por PCR utilizando-se primers para os genes *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* (Wang et al., 2002) e *stx2d* (Zheng et al. 2008). A tipagem do gene *eae* foi realizada por PCR e sequenciamento, de acordo com Blanco et al. (2006).

2.6. Ensaio de citotoxicidade em células Vero

A produção de Stx pelos isolados STEC foi verificada através do ensaio de citotoxicidade em células Vero (rim de macaco verde africano), conforme descrito previamente por Beutin et al. (2002), com modificações.

A extração dos sobrenadantes foi realizada de acordo com Rocha e Piazza (2007), que descrevem um protocolo para a obtenção de maiores quantidades de Stx. Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo LB a 37°C por 18 h sob agitação a 180 rpm. Após este período, uma diluição de 1:100 foi realizada em caldo EC (Merck) suplementado com ciprofloxacina 5 ng/mL (Sigma-Aldrich), seguido por

incubação por 4 h a 37°C sob agitação a 250 rpm. Alíquotas de 1.5 mL dos cultivos foram centrifugadas a 13 000 x g por 10 min, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a - 20°C.

Placas de 96 poços foram semeadas com aproximadamente 2×10^5 células/mL e incubadas por 24 h a 37° e 5% CO₂. O meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Cultiab), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina 50 µg/mL, foi aspirado e substituído pelo meio teste (DMEM contendo 2% SFB e gentamicina 50 µg/mL). Os sobrenadantes foram adicionados ao meio de cultivo na diluição 1:10 em duplicatas e, em seguida, as placas foram incubadas por 72 h a 37°C e 5% CO₂. Células incubadas apenas com o meio, sem toxinas, foram utilizadas como controle.

A citotoxicidade dos isolados foi quantificada após a análise da atividade metabólica das células pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio), de acordo com Murakami et al. (2000). Após a exposição das células aos sobrenadantes, o meio foi aspirado e 30 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich) [1mg/mL em tampão fosfato salina (PBS)], foram adicionados, seguido por incubação a 37°C e 5% CO₂ por 4 h. Após a remoção do MTT, 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO; Merck) foram adicionados, as placas foram mantidas por 10 minutos sob leve agitação e, em seguida, a absorbância foi medida por espectrofotometria a 550 nm em leitor de ELISA Multiskan EX (Labsystems). O percentual citotoxicidade foi determinado pela fórmula $1 - (A_{amostra}/A_{controle}) \times 100$. Um isolado foi considerado altamente citotóxico quando atingido um percentual de 50% ou mais de morte celular quando comparado ao controle.

2.7. Teste de adesão em células HEp-2

A capacidade de aderência dos isolados às células epiteliais HEp-2 (carcinoma de laringe humana) foi verificada de acordo com a técnica descrita por Cravioto et al. (1979), após 6 horas de interação bactéria-célula.

As células HEp-2 foram cultivadas em placas de 24 orifícios com lamínulas, contendo 1 mL de DMEM contendo antibióticos (gentamicina 50 µg/mL, anfotericina B 2 µg/mL), acrescido de 10% SFB . Após a formação de camada subconflente (80%), o meio foi descartado e as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) esterilizado e em cada orifício foi adicionado 960 µL de DMEM (sem antibiótico)

acrescido de 2% de SFB e 1% de D-manose. Para a realização dos ensaios de adesão, as amostras bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo tríptico de soja (TSB; Difco) e incubadas a 37°C por 18 h em condições estáticas. Uma alíquota de 40 µL da cultura bacteriana foi adicionada a cada orifício. As placas foram incubadas por 3 h a 37° C e, após este período, lavadas cinco vezes com PBS estéril, acrescidas de 1 mL de DMEM sem antibiótico (2% SFB e 1% de D-manose) e incubadas por mais 3 horas a 37°C. Ao fim do período total de 6 h, as placas foram lavadas cinco vezes com 1 mL de PBS estéril por orifício para retirada das bactérias não aderidas. As lâminulas foram fixadas com metanol absoluto por 30 min e, em seguida, coradas por 5 min com May-Grünwald (Merck) e por 20 min com Giemsa (Merck), diluídos 1:2 e 1:3 em PBS, respectivamente. As preparações foram observadas em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes e os padrões de adesão definidos conforme descrito previamente (Scaletsky et al., 1984; Nataro et al., 1987; Rodrigues et al., 1996).

2.8. *Deteccção da produção de hemolisinas*

A pesquisa de hemolisinas foi realizada de acordo com Beutin et al. (1989). As amostras bacterianas foram cultivadas em TSB por 18 h a 37°C sob agitação a 180 rpm e, posteriormente, semeadas em placas contendo ágar sangue, suplementado com CaCl₂ 10 mM e 5% de eritrócitos de carneiro lavados três vezes em PBS. As placas foram observadas após 3 e 24 h de incubação a 37°C. As cepas *E. coli* U4-41 (α-hemolisina) e C3888 (enterohemolisina) foram utilizadas como controles positivos.

2.9. *Determinação dos grupos filogenéticos*

Os grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) foram determinados por PCR triplex com os marcadores *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2, de acordo com Clermont et al. (2000).

3. **Resultados**

3.1. *Prevalência de STEC*

STEC foram detectadas em 65 (50.0%) das 130 amostras fecais de ovinos analisadas. A prevalência de STEC nas propriedades variou de 16.6% a 85.6% (Tabela 1), sendo este patotipo encontrado em todos os rebanhos amostrados.

De cada amostra *stx*-positiva, foi selecionado um isolado/genótipo para posterior caracterização dos sorotipos e perfis de virulência.

3.2. Sorotipos

Ao todo 70 isolados STEC foram obtidos, dos quais 61 foram tipáveis para o antígeno somático (O), enquanto que os demais foram não-tipáveis (ONT). Com relação ao antígeno flagelar, 45 isolados apresentaram 10 diferentes tipos de H e 25 foram não-móveis (H-). Um total de 23 sorotipos O:H foram identificados (Tabela 1). No entanto, 65.7% dos isolados STEC pertenciam a apenas seis sorotipos (O76:H19, O65:H-, O75:H-, O91:H-, O75:H14 e O128:H2). Três novos sorotipos O:H não reportados previamente em STEC foram encontrados (O75:H14, O169:H7 e O170:H7). A maioria (87.1%) dos isolados pertencia a sorotipos previamente encontrados em humanos, muitos dos quais associados à SHU, como O5:H-, O75:H-, O91:H-, O128:H2 e O103:H2.

Alguns sorotipos foram amplamente distribuídos entre as propriedades (Tabela 1), como O76:H19 e O91:H-, verificados em seis e quatro rebanhos, respectivamente. Em contraste, O171:H2 e ONT:H28 ocorreram exclusivamente em uma única propriedade (A e F, respectivamente). Cinco (7.7%) dos 65 animais positivos para STEC apresentaram mais de um sorotipo. Interessantemente, O102:H6 foi isolado exclusivamente de animais que apresentavam outro sorotipo de STEC.

3.3. Genes de virulência

Dentre os 70 isolados STEC, 37 (52.8%) apresentavam apenas o gene *stx1*, 10 (14.3%) possuíam apenas *stx2* e 23 (32.9%) portavam ambos, *stx1* e *stx2*. Isolados STEC portando apenas *stx1* foram associados aos sorotipos O65:H- e O76:H19, enquanto que aqueles positivos para ambos *stx1* e *stx2* foram associados aos sorotipos O91:H- e O75:H14.

O subtipo *stx2b* foi o mais comumente observado, presente em 26 isolados, enquanto que *stx2c* foi detectado em sete isolados, seis dos quais em combinação com *stx2b*. Dois isolados apresentaram *stx2d*, nenhum *stx2a* e em outros quatro os subtipos não foram determinados (*stx2ND*).

Apenas quatro (5.7%) isolados apresentaram o gene *eae*, sendo o subtipo *eae-ε1* observado em dois e *eae-γ1* em um outro. Não foi possível a determinação do tipo de *eae* em um isolado (*eae-ND*). Os isolados *eae*-positivos pertenciam aos sorotipos O103:H2 (*eae-ε1*), O172:H- (*eae-ε1*), ONT:H7 (*eae-γ1*) e O169:H7 (*eae-ND*).

O gene *ehxA* foi detectado em 61 (87.1%) isolados, enquanto que *cdtV* (2.8%) e *subAB* (1.4%) foram pouco frequentes. Com exceção de um, todos os demais isolados STEC apresentavam ao menos um gene codificando adesinas. Dentre estes, *lpf_{O113}* foi o mais frequentemente observado (95.7%), enquanto que *saa* e *iha* foram observados em menores frequências, 54.3% e 10.0%, respectivamente.

3.4. Características fenotípicas

Todos os sobrenadantes de culturas produziram efeito citotóxico em células Vero. A quantificação dos percentuais de citotoxicidade pelo ensaio de MTT permitiu considerar 35 isolados STEC como altamente citotóxicos (Figura 1A e B). Quanto ao genótipo *stx*, 59.4% dos isolados *stx1*, 50.0% dos isolados *stx2* e 34.8% daqueles que portavam ambos *stx1 stx2* apresentaram alta citotoxicidade, respectivamente. Com relação aos sorotipos, 75.0% e 72.2% dos isolados pertencentes a O65:H- e O76:H19 foram altamente citotóxicos, respectivamente.

Todos os isolados foram aderentes a células HEp-2 após 6 h de teste, sendo verificados diferentes fenótipos de adesão. Vinte e nove (41.4%) isolados demonstraram um padrão indefinido (IND), 21 (30.0%) apresentaram adesão agregativa (AA), 12 (17.1%) expressaram o fenótipo de adesão localizada-like (ALL), seis (8.5%) aderiram difusamente (AD) e dois (3.0%) apresentaram um padrão misto (AA/AD). Nenhuma correlação entre fenótipo de adesão, sorotipos e genes de virulência foi observada (Tabela 1)

A produção de enterohemolisina (Ehly) foi detectada em 42 (68.8%) dos 61 isolados STEC que portavam o gene *ehxA*. Nenhum isolado produziu α -hemolisina.

3.5. Tipagem filogenética

Os isolados STEC pertenciam principalmente ao filogrupo B1 (90.0%) e, em menor proporção, aos grupos A (5.7%) e D (4.3%).

Algumas particularidades puderam ser observadas dentre os isolados STEC pertencentes aos filogrupos A e D em relação aos genótipos de virulência. STEC do grupo A foram positivas apenas para *stx2* e não apresentavam *saa*, enquanto que os isolados do grupo D portavam apenas *stx1* (Tabela 1).

Os isolados STEC obtidos de animais do rebanho F foram os mais heterogêneos filogeneticamente, agrupados nos três filogrupos observados neste estudo. Todas STEC do filogrupo D foram isoladas deste rebanho.

4. Discussão

Neste estudo, investigamos a presença de STEC em dez propriedades de ovinos no Estado do Paraná, detectando este patótipo em todos os rebanhos analisados. Dados similares a estes foram reportados na Espanha (Rey et al., 2003), Noruega (Urdahl et al., 2003), Austrália (Djordjevic et al., 2004), Suíça (Zweifel et al., 2004) e, mais recentemente, Alemanha (Schilling et al., 2012), onde STEC foram detectadas em mais de 90.0% dos rebanhos. A ampla ocorrência de STEC nas propriedades enfatiza a importância dos ovinos como reservatórios para este patótipo.

Para nosso entendimento, este consiste no primeiro relato da ocorrência de STEC em ovinos da região Sul do país. No Estado de São Paulo, STEC foram detectadas em 52.0% dos animais (Vettorato et al., 2003; 2009), uma prevalência muito semelhante àquela reportada neste estudo (50.0%). Um total de 70 isolados STEC foi caracterizado genotípica e fenotipicamente, sendo observada uma grande diversidade de sorotipos e perfis de virulência, correspondendo ao que tem sido documentado em ovinos por outros estudos (Blanco et al., 2003; Zweifel et al., 2004; Vettorato et al., 2009).

Cerca de 53 sorogrupos O e 105 sorotipos O:H têm sido descritos em STEC isoladas de ovinos (<http://www.usc.es/ecoli/SEROTIPOSOWI.htm>). Neste estudo, 23 sorotipos foram identificados, incluindo três novos não descritos anteriormente em STEC (Tabela 1). Apenas sete destes sorotipos (O5:H-, O75:H-, O91:H-, O128:H2,

O172:H-, O174:H8, ONT:H16 e ONT:H-) têm sido reportados previamente em STEC de ovinos no Brasil (Vettorato et al., 2003; 2009), sugerindo uma variação geográfica na prevalência de sorotipos de STEC nestes animais.

Os sorotipos mais prevalentes neste estudo foram O76:H19, O65:H-, O75:H-, O91:H-, O128:H2 e O75:H14, abrangendo 65.7% dos isolados. Dentre estes sorotipos, O91:H- e O128:H2 são frequentemente observados em ovinos, enquanto que O76:H19 e O65:H- ocorrem mais raramente nestes animais (Blanco et al., 2003; Djordjevic et al., 2004; Zweifel et al., 2005; Vettorato et al., 2009). Interessantemente, os sorotipos O79:H14, O116:H21, ONT:H7, ONT:H16 e ONT:H-, observados em nossos isolados, também têm sido identificados em bovinos no Estado do Paraná (Farah et al., 2007; Pigatto et al., 2008), sugerindo que alguns sorotipos de STEC podem ser compartilhados por diferentes hospedeiros.

Sessenta e um (87.1%) isolados pertenciam a sorotipos previamente descritos em STEC de humanos (Tabela 1), muitos dos quais associados com SHU, como O75:H-, O91:H- e O128:H2, três dos mais frequentes sorotipos neste estudo, além de O5:H- e O103:H2. A ocorrência destes sorotipos de STEC em ovinos é de extrema importância, uma vez que estes animais têm sido implicados como fonte de infecção em casos esporádicos e surtos de SHU (Starr et al., 1998; Schimmer et al., 2008).

Com relação ao genótipo *stx*, 52.8% dos isolados portavam apenas o gene *stx1*, estando de acordo com aquilo previamente reportado por outros autores (Blanco et al., 2003; Djordjevic et al., 2004; Zweifel et al., 2004; Sanchez et al., 2010). No entanto, alguns estudos relatam que STEC de ovinos apresentavam mais comumente o genótipo *stx1 stx2* (Rey et al., 2003; Vettorato et al., 2003; Shilling et al., 2012). Essa disparidade pode ser devido à variabilidade de sorotipos ocorrendo em diferentes regiões geográficas. Um dado comum a todos estes estudos é a baixa ocorrência em ovinos de STEC apresentando apenas o gene *stx2*, fato este também evidenciado em nossos isolados.

O subtipo *stx2b*, predominante em nossos isolados, é epidemiologicamente associado à STEC de ovinos, ocorrendo na grande maioria das cepas *stx2*-positivas isoladas de fezes e alimentos originados destes animais (Ramachandran et al., 2001; Vettorato et al., 2009; Martin and Beutin, 2011). Cepas portando *stx2b* são tidas como de baixa virulência, associadas principalmente a infecções assintomáticas ou diarreias moderadas (Beutin et al., 2004). Entretanto,

recentemente foi descrito um caso de SHU ocasionado por uma cepa de STEC *stx2b*-positiva/*eae*-negativa, com evidências de transmissão da mãe para o recém-nascido (Stritt et al., 2012). Isto sugere que STEC *stx2b*-positivas também podem levar a quadros mais severos da infecção. Também é válido ressaltar que os subtipos *stx2c* e *stx2d*, frequentemente associados com casos severos de doenças em humanos (Friedrich et al., 2002; Beutin et al., 2004), também foram identificados em STEC de ovinos neste estudo.

Apenas quatro de nossos isolados foram positivos para *eae*, condizente com outros estudos que reportam uma baixa frequência deste gene em STEC de ovinos (Blanco et al., 2003; Djordjevic et al., 2004; Sánchez et al., 2010). Estes isolados apresentavam os seguintes sorotipos e subtipos de intimina: O103:H2 (ϵ 1), O169:H7 (*eae*-nd), O172:H- (ϵ 1) e ONT:H7 (γ 1). A ocorrência de sorotipos de STEC *eae*-positiva em ovinos não havia sido documentada até então no Brasil (Vettorato et al., 2003; 2009). Outro dado interessante deste estudo é a descrição de um perfil de virulência (O103:H2 *stx1 eae ehxA*) previamente associado a casos graves de infecções por STEC no Brasil (Guth et al., 2005). Este parece ser, ao nosso conhecimento, a primeira descrição de STEC pertencente ao sorotipo O103:H2 em animais no país, enfatizando a importância dos ovinos como fonte de infecção em humanos.

Embora a presença do gene *eae* esteja associada com cepas mais virulentas e maior severidade da doença (Friedrich et al., 2002), STEC *eae*-negativas também são responsáveis por casos esporádicos de SHU e surtos, como o recentemente ocorrido na Alemanha (Frank et al., 2011).

A presença do gene *ehxA* em cepas patogênicas de STEC tem sido associado aos quadros mais graves da infecção em humanos (Beutin et al., 2004). Uma alta prevalência (87.1%) deste gene foi observada em nossos isolados, confirmando que a combinação de *stx* com *ehxA* ocorre mais frequentemente em STEC de ovinos do que *stx* e *eae* (Ramachandran et al., 2001; Blanco et al., 2003; Vettorato et al., 2009). No entanto, apenas 68.8% destes isolados expressaram Ehly. Outros autores também reportaram a falta de expressão de Ehly em STEC de ovinos, sugerindo que a expressão do fenótipo enterohemolítico seja mais comum em cepas de bovinos (Cobeljic et al., 2005; Cookson et al., 2007).

A aderência e colonização do epitélio intestinal é um importante componente na patogênese de STEC, sendo este processo mediado por diferentes adesinas

(Bardiau et al., 2010). Neste estudo, todos os isolados STEC foram aderentes a culturas de células HEp-2 e, com exceção de um, portavam genes associados à adesinas, como intimina, Lpf, Saa e Iha. Portanto, é possível que estas adesinas, assim como outras não investigadas, estejam contribuindo para a adesão destes isolados a células epiteliais *in vitro*, embora mais estudos sejam necessários para evidenciar isso.

Todos os isolados aqui descritos produziram efeitos tóxicos em células Vero, porém diferentes percentuais de citotoxicidade foram verificados (Figura 1A e B). Estudos prévios demonstraram que esta linhagem celular é mais sensível à Stx1 em relação à Stx2 (Kawano et al., 2008), o que poderia explicar o predomínio de STEC portando apenas *stx1* entre os isolados mais citotóxicos.

A tipagem filogenética revelou que a maioria (90.0%) dos isolados STEC estudados pertencia ao filogrupo B1. Nossos resultados são similares àqueles reportados previamente (Girardeau et al., 2005; Ishi et al., 2007), sugerindo que um específico *background* genômico é necessário para manutenção e expressão de genes *stx* em *E. coli*.

Os resultados deste estudo sugerem que os ovinos podem ser considerados um importante reservatório de STEC em nosso meio, uma vez que sorotipos e perfis de virulência associados com doenças em humanos foram identificados. Desse modo, a ocorrência de STEC potencialmente patogênicas em animais de produção é de grande preocupação em termos de saúde pública, principalmente devido à possibilidade de transmissão deste patótipo ao homem através de alimentos contaminados.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Agostinho Ludovico pela contribuição na coleta das amostras, ao Laboratório de Virologia (Universidade Estadual de Londrina) pelo fornecimento das culturas de células HEp-2 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências

- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco J.E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D.L., Silveira, W.D., Pestana de Castro, A.F., 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 20, 297-306.
- Bardiau, M., Szalo, M., Mainil, J. G., 2010. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Veterinary Research* 41, 57.
- Beutin, L., Montenegro, M.A., Ørskov, I., Ørskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., 1989. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2559-2564.
- Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2483–2488.
- Beutin, L., Zimmermann, S., Gleier, K., 2002. Evaluation of the VTEC-Screen “Seiken” test for detection of different types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 42, 1-8.
- Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., Gleier, K., 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1099–1108.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Gonzalez, E.A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T.A., Zerbini, L.F., Yano, T., Pestana de Castro, A.F., Blanco, J., 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 35_2958-2963.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J.M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M.P., Dahbi, G., González, E.A., 2003. Serotypes, virulence genes, and

intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1351-1356.

Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Alonso, M.P., Mora, A., Coira, M.A., Madrid, C., Juárez, A., Bernárdez, M.I., González, E.A., Blanco, J., 2006. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology* 9, 103–110.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugèreb, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research* 36, 289–311.

Cergole-Novella, M.C., Nishimura, L.S., Dos Santos, L.F., Irino, K., Vaz, T.M., Bergamini, A.M., Guth, B.E., 2007. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiology Letter* 274, 329-334.

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4555–4558.

Cobeljic, M., Dimic, B., Opacic, D., Lepsanovic, Z., Stojanovic, V., Lazic, S., 2005. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals in Serbia. *Epidemiology and Infection* 133, 359-366.

Cookson, A.L., Bennett, J., Thomson-Carter, F., Attwood, G.T., 2007. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6360-6369.

Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S., Rowe, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology* 3, 95-99.

Djordjevic, S.P., Ramachandran, V., Bettelheim, K.A., Vanselow, B.A., Holst, P., Bailey, G., Hornitzky, M.A., 2004. Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3910–3917.

- Doughty, S., Sloan, J., Bennet-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E., 2002. Identification of a novel fimbrial gene related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 70, 6761–6769.
- Eklund, M., Leino, K., Siitonen, A., 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying genes: *stx* and *stx*-positive virulence profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4585-4593.
- Farah, S.M.S.S., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Irino, K., Silva, L.R., Rigo, L.U., Steffens, M.B.R., Pigatto, C.P., Fadel-Picheth, C.M.T., 2007. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 44, 606–612.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., 2011. Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany - preliminary report. *New England Journal Medical*. In press.
- Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., Karch, H., 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infection Diseases* 185, 74-84.
- Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozy-Rozand, C., Martin, C., 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 6098–6107.
- Guinée, P.A.M., Jansen, H.W., Wadstroöm, T., Sellwood, R., 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: De Leeww, P.W., Guinée, P.A.M. (Eds.), *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science*, vol. 13. Martinus Nijhoff, Hague, The Netherlands, pp. 126–162.
- Guth, B.E.C., Vaz, T.M.I., Gomes, T.A.T., Chinarelli, S.H., Rocha, M.M.M., de Castro, A.F.P., Irino, K., 2005. Re-emergence of O103:H2 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 54, 805–806.

- Horcajo, P., Domínguez-Bernal, G., de la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., López, C., Puentes, B., Alonso, M.P., Blanco, J., Orden, J.A., 2011. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. *Veterinary Microbiology* 155, 341-348.
- Irino, K., Vaz, T.M.I., Medeiros, M.I.C., Kato, M.A.M., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., Guth, B.E.C., 2007. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 56, 565-567.
- Ishii, S., Meyer, K.P., Sadowsky, M.J., 2007. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5703–5710.
- Kawano, K., Okada, M., Haga, T., Maeda, K., Goto, Y., 2008. Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 27, 227–232.
- Martin, A., Beutin, L., 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International Journal of Food Microbiology* 146, 99-104.
- Murakami, J., Kishi, K., Hirai, K., Hiramatsu, K., Yamasaki, T., Nasu, M., 2000. Macrolides and clindamycin suppress the release of Shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 15, 103–109.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V.; Vial, P., Levine, M. M., 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Disease Journal* 6, 829-831.
- Nataro, P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 142–201.
- Oliveira, M.G., Brito, J.F.R., Gomes, T.A.T., Guth, B.E.C., Vieira, M.A.M., Naves, Z.V.F., Vaz, T.M.I., Irino, K., 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. International Journal of Food Microbiology 127, 139-146.

Paton, J.C., Paton, A.W., 1998a. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clinical Microbiology Reviews 11, 450–479.

Paton, A.W., Paton, J.C., 1998b. Detection and characterisation of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. Journal of Clinical Microbiology 36, 598–602.

Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., Paton, J.C., 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infection and Immunity 69, 6999–7009.

Paton, A.W., Paton, J.C., 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. Journal of Clinical Microbiology 40, 271-274.

Paton, A.W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., Paton, J.C., 2004. A new family of potent AB₅ cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. Journal of Experimental Medicine 200, 35-46.

Pigatto, C.P., Schocken-Iturrino, R.P., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Comarella, L., Irino, K., Kato, M.A., Farah, S.M., Warth, J.F., Fadel-Picheth, C.M., 2008. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. Canadian Journal of Microbiology 54, 588–593.

Ramachandran, V., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2001. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. Journal of Clinical Microbiology 39, 1932–1937.

Rey, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Usera, M. A., Gonzalez, E.A., Bernardez, M. I., Blanco, J., 2003. Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. Veterinary Microbiology 94, 47-56.

- Rocha, L.B., Piazza, R.M., 2007. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* in broth media: from divergence to definition. *Letters in Applied Microbiology* 45, 411-417.
- Rodrigues, J., Scaletsky, I.C.A., Campos, L.C., Gomes, T.A.T., Whittam, T.S., Trabulsi, L.R., 1996. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infection and Immunity* 64, 2680–2686.
- Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Benítez, J. M., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., López, C., Mora, A., Alonso, J. M., Rey, J., 2010. Variation in the prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in four sheep flocks during a 12-month longitudinal Study. *Small Ruminant Research* 93,144–148.
- Scaletsky, I.C.A., Silva, M.L.M., Trabulsi, L.R., 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity* 45, 534–536.
- Scheutz, F., Strockbine, N.A., 2005. Genus I. *Escherichia*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, pp. 607–624.
- Schilling, A.K., Hotzel, H., Methner, U., Sprague, L.D., Schmoock, G., El-Adawy, H., Ehricht, R., Worh, A.C., Erhard, M., Geue, L., 2012. Zoonotic agents in small ruminants kept on city farms in southern Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3785-3793.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H. M., 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infectious Diseases* 8, 41-50.
- Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmidencoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity* 63, 1055–1061.
- Souza, R.L., Carvalhaes, J.T.A., Nishimura, L.S., de Andrade, M.C., Guth, B.E.C., 2011. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. *Open Microbiology Journal* 5, 76-82.
- Starr, M., Bennett-Wood, V., Bigham, A.K., de Koning-Ward, T.F., Bordun, A.M., Lightfoot, D., Bettelheim, K.A., Jones, C.L. et al. 1998. Haemolytic–uraemic syndrome

following urinary tract infection with enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: case report and review. *Clinical Infectious Disease* 27, 310–315.

Stritt, A., Tschumi, S., Kottanattu, L., Bucher, B.S., Steinmann, M., von Steiger, N., Stephan, R., Hachler, H., Simonetti, G.D., 2012. Neonatal Hemolytic Uremic Syndrome after mother-to-child transmission of a low-pathogenic *stx2b* harboring Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases* 56, 114-116.

Tarr, P.I., Bilge, S.S., James, C., Vary, J.C., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, T.E., Besser, M.R., 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity* 68, 1400–1407.

Timm, C. D., Irino, K., Gomes, T. A. T., Vieira, M. M., Guth, B. E. C., Vaz, T. M. I., Moreira, C. N., Alleixo, J. A. G., 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 44, 419-425.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R., 1982a. EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano-desaminase. *Revista Microbiologia* 13, 309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R., 1982b. MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Revista Microbiologia* 13, 230-235.

Urdhal, A. M., Beutin, L., Skjerve, E., Zimmermann, S., Wasteson, Y., 2003. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm, *Journal of Applied Microbiology* 95, 92-101.

Vettorato, M.P., Leomil, L., Guth, B.E.C., Irino, K., Pestana, A.F.C., 2003. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Microbiology* 95, 103-109.

Vettorato, M.P., De Castro, A.F.P., Cergole-Novella, M.C., Camargo, F.L.L., Irino, K., Guth, B.E.C., 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy sheep of different populations in São Paulo, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 49, 53–59.

Wang, G., Clark, C.G., Rodgers, F.G, 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3613–3619, 2002.

Zheng, J., Cui, S., Teel, L.D., Zhao, S., Singh, R., O'Brien, A.D., Meng, J., 2008. Identification and characterization of Shiga toxin type 2 variants in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and humans. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5645–5652.

Zweifel, C., Zychowska, M. A., Stephan, R., 2003. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* 92, 45 – 53.

Tabela 1 – Prevalência, sorotipos e propriedades de virulência de STEC isoladas de ovinos no Estado do Paraná.

Propriedade	No. animais examinados	No. animais STEC positivos (%)	Animal	Sorotipo	Perfil genotípico	Características fenotípicas			Filogrupo
						Stx	Hem.	Adesão	
A	24	11 (45,8)	2	O79:H14 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			10	O171:H2 ^{a,b}	<i>stx2b stx2c lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			11	O128:H2 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			12	O128:H2 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			13	O5:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			19	O171:H2 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			20	O91:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113} iha</i>	+	Ehly	AD	B1
			21	O91:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113} iha</i>	+		IND	B1
			22	O128:H2 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA lpf_{O113}</i>	+		IND	B1
				O116:H21 ^b	<i>stx2d ehxA saa lpf_{O113} iha subAB cdtV</i>	+	Ehly	IND	B1
				O171:H2 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b lpf_{O113}</i>	+		IND	B1
				O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AD	B1
				O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		IND	B1
B	12	7 (58,3)	29	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA/AD	B1
				O102:H6 ^b	<i>stx2b ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	A
			30	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			31	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			32	O91:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b saa iha</i>	+		IND	B1
			34	ONT:H16 ^{a,b}	<i>stx1 lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			35	ONT:H16 ^{a,b}	<i>stx1 lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			36	O123:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
C	8	4 (50,0)	40	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AD	B1
			41	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa</i>	+	Ehly	IND	B1
			42	O106/O185:H7	<i>stx2d ehxA lpf_{O113}</i>	+		AD	B1
			44	O128:H2 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1

Tabela 1 (continuação)

Propriedade	No. animais examinados	No. animais STEC positivos (%)	Animal	Sorotipo	Perfil genotípico	Características fenotípicas			Filogrupo
						Stx	Hem.	Adesão	
D	5	3 (60,0)	47	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			48	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	ALL	B1
			49	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	ALL	B1
E	17	9 (52,9)	52	O170:H7 ^c	<i>stx2b ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			54	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			56	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			60	O172:H- ^{a,b}	<i>stx2ND eae-ε1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	ALL	A
			61	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			62	O91:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA lpf_{O113} iha</i>	+	Ehly	IND	B1
			64	O75:H14 ^c	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		ALL	B1
			65	O75:H14 ^c	<i>stx1 stx2b stx2c ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			66	O102:H6 ^b	<i>stx2b stx2c ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	A
				O169:H7 ^c	<i>stx2ND eae-ND ehxA lpf_{O113} cdtV</i>	+	Ehly	IND	B1
F	23	14 (60,8)	67	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			68	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			70	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	ALL	B1
			71	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	ALL	B1
			72	ONT:H7 ^a	<i>stx1 eae-γ1 ehxA lpf_{O113} iha</i>	+	Ehly	ALL	D
			73	ONT:H28 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	ALL	B1
			75	ONT:H- ^{a,b}	<i>stx2b stx2c lpf_{O113}</i>	+		AA/AD	A
			76	O174:H8 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			77	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			78	ONT:H28 ^{a,b}	<i>stx1 lpf_{O113}</i>	+		ALL	B1
			83	ONT:H42	<i>stx1 stx2b ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
85	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	D			

Tabela 1 (continuação)

Propriedade	No. Animais examinados	No. animais STEC positivos (%)	Animal	Sorotipo	Perfil genotípico	Características fenotípicas			Filogrupo
						Stx ^d	Hem. ^e	Adesão ^f	
F			87	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	D
			88	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
G	9	6 (66,6)	93	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+	Ehly	IND	B1
			94	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		IND	B1
			95	O91:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b saa lpf_{O113}</i>	+		IND	B1
			96	O65:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			97	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2c ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			98	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		IND	B1
H	18	3 (16,6)	105	O75:H14 ^c	<i>stx1 stx2b ehxA saa</i>	+		IND	B1
			107	O75:H14 ^c	<i>stx1 stx2b stx2c ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			116	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AD	B1
I	7	6 (85,7)	117	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA lpf_{O113}</i>	+	Ehly	AA	B1
			119	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			120	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		ALL	B1
			121	ONT:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2ND ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
				O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 stx2b ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AD	B1
			122	O75:H- ^{a,b}	<i>stx1 stx2ND ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		AA	B1
			123	O76:H19 ^{a,b}	<i>stx1 ehxA saa lpf_{O113}</i>	+		ALL	B1
J	7	2 (28,5)	125	O103:H2 ^{a,b}	<i>stx1 eae-ε1 ehxA lpf_{O113} iha</i>	+		ALL	B1
			129	ONT:H16 ^{a,b}	<i>stx2b</i>	+		IND	B1
Total	130	65 (50,0)							

^a Sorotipos descritos anteriormente em STEC de ovinos

^b Sorotipos previamente encontrados em humanos – em **negrito**, sorotipos associados com SHU

^c Novos sorotipos não descritos anteriormente em STEC

^d Citotoxicidade em células Vero

^e Produção de hemolisinas – Ehly: enterohemolisina

^f Padrão de adesão em células HEp-2 após 6 h – AA: adesão agregativa; AD: adesão difusa; ALL: adesão localizada-like; IND: padrão indefinido

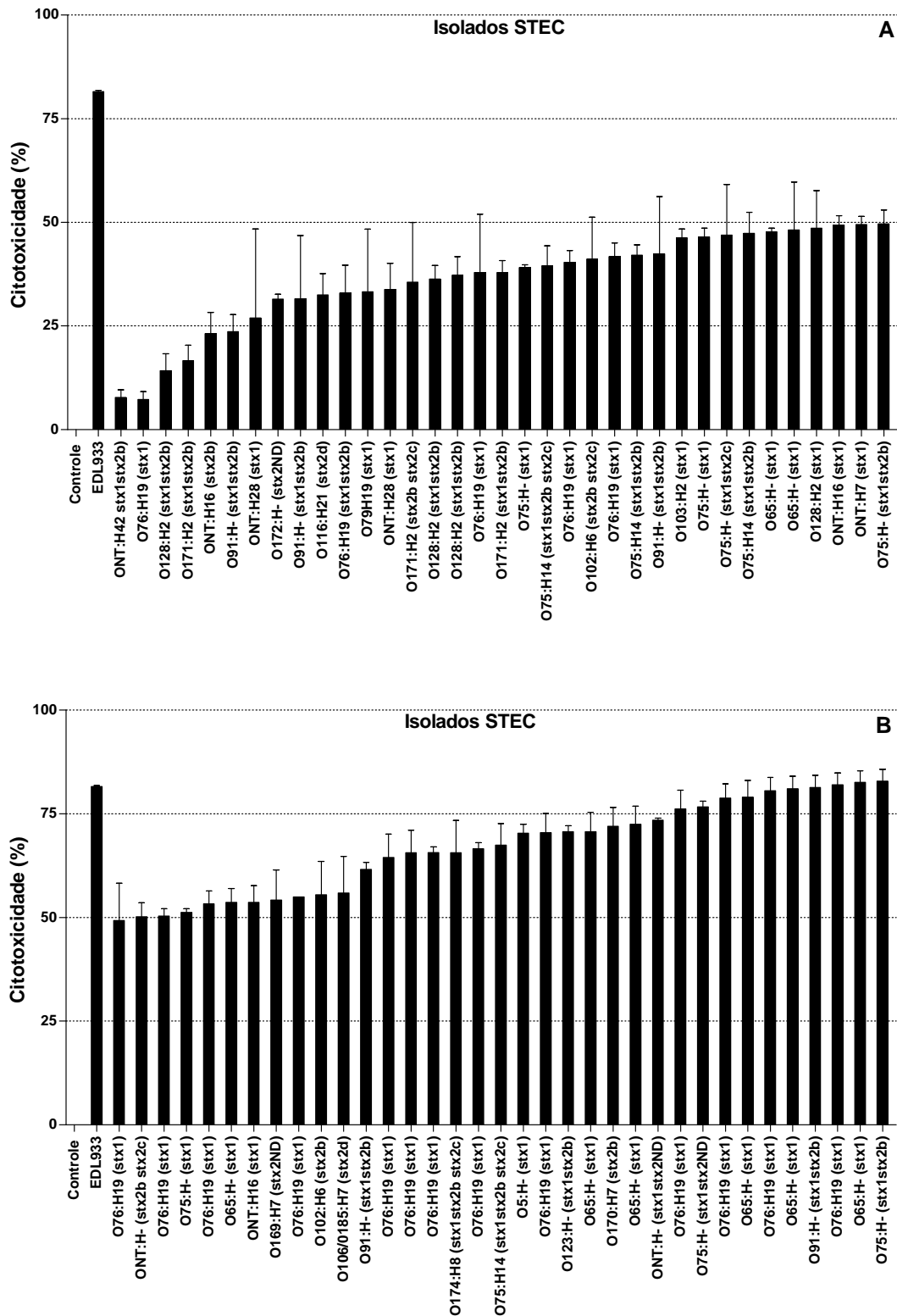


Figura 1 (A e B) – Citotoxicidade dos isolados STEC. Os sobrenadantes dos cultivos bacterianos foram incubados com células Vero e, após 72 h, o percentual de citotoxicidade foi determinado por MTT, comparando-se ao controle (meio sem toxina). A morte de mais de 50% células foi considerada como alta citotoxicidade. Os dados correspondem às duplicatas de dois experimentos independentes.

Tabela S1 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados.

Primer	Sequência (5' - 3')	Gene alvo	Tamanho do Fragmento (pb)	Referências
Stx1-F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>stx1</i>	180	Paton e Paton (1998b)
Stx1-R	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
Stx2-F	GGCCTGTCTGAAACTGCTCC	<i>stx2</i>	255	Paton e Paton (1998b)
Stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
eaeA-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i>	384	Paton e Paton (1998b)
eaeA-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG			
hlyA-F	GCATCATCAAGCGTAGCTTCC	<i>ehxA</i>	534	Paton e Paton (1998b)
hlyA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
SAADF	CCTCACATCTTCTGCAAATACC	<i>saa</i>	119	Paton e Paton (2002)
SAADR	GTTGTCCTGCAGATTTACCAATGGA			
lpfA-F	ATGAAGCGTTAATATTATAG	<i>lpfA₀₁₁₃</i>	573	Doughty et al. (2002)
lpfA-R	TTATTTCTTATATTTCGAC			
lha-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	<i>lha</i>	827	Tarr et al. (2000)
lha-R	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA			
SubAF	GTACGGACTAACAGGGAAGCTG	<i>subAB</i>	1823	Paton e Paton (2005)
SubBR	GCAAAAAGCCTTCGTGTAGTC			
cdtV-F	TTCATTGTTGCTCCTCTG	<i>cdtV</i>	755	Cergole-Novella et al. (2007)
cdtV-R	TTTATAAAGCTGGTATCCTG			
Stx2-a	GCGGTTTTATTTGCATTAGC	<i>stx2a</i>	115	Wang et al. (2002)
Stx2-b	TCCCGTCAACCTTCACTGTA			
Stx2b-a	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	<i>stx2b</i>	175	Wang et al. (2002)
Stx2b-b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
Stx2c-a	GCGGTTTTATTTGCATTAGT	<i>stx2c</i>	124	Wang et al. (2002)
Stx2c-b	AGTACTCTTTCCGGCCACT			
Stx2d-activatable	CTTTATATACAACGGGTG	<i>stx2d</i>	359	Zheng et al. (2008)
CKS2	CTGAATTGTGACACAGATTAC			
EAE-1	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	<i>eae*</i>	775	Blanco et al. (2006)
EAE-2	GGCGCTCATCATAGTCTTTC			
ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<i>chuA</i>	279	Clermont et al. (2000)
ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
YjaA.1	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	<i>yjaA</i>	211	Clermont et al. (2000)
YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TspE4C2.1	GAGTAATGTGCGGGCATTCA	TSPE4.C2	152	Clermont et al. (2000)
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

*Detecta todos os tipos de intimina descritos até o momento. Os isolados positivos para o gene *eae* universal foram testados separadamente para todos os tipos de intimina, cujos oligonucleotídeos específicos estão disponíveis em <http://www.im.microbios.org/0902/0902103Tables1S2S3SBlancoONLINE.pdf>

*Artigo em elaboração que será submetido à revista *Veterinary Microbiology*

Caracterização de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) isoladas de ovinos sem diarreia

Fernando Henrique Martins^a, Juan Marzoa Fandiño^b, Ghizlane Dahbi^b, Waldir Pereira Elias^c, Beatriz Ernestina Cabilio Guth^d, Jorge Blanco^b, Jacinta Sanchez Pelayo^{a*}

^a Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa postal 10011, 86 057 – 970 Londrina, PR, Brasil

^b Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Espanha

^c Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, 05503 – 900 São Paulo, SP, Brasil

^d Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Universidade Federal de São Paulo, 04023 – 062, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência: jspelayo@uel.br Fone: (+55 43) 3371 4494

Resumo

Amostras fecais de 130 ovinos sem diarreia pertencentes a dez propriedades no Estado do Paraná foram investigadas quanto à presença de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Pela técnica da PCR multiplex, foram identificadas EPEC em 19,2% dos animais, todos com até 12 meses de idade. Um total de 25 isolados foi obtido, todos os quais negativos para o gene *bfpA*, sendo então designados como EPEC atípicas (aEPEC). Os isolados foram caracterizados com relação aos genótipos, grupos filogenéticos, sorotipos, padrões de aderência a células HEp-2 e produção de hemolisinas. A presença dos genes *ehxA*, *iha* e *lpf*₀₁₁₃ foi verificada em 60%, 20% e 88% dos isolados, respectivamente. Os subtipos *eae-β1* e *eae-θ1* foram os mais frequentes entre as aEPEC. O gene *tirY-P* foi observado em 84% dos isolados, enquanto que *tirS* (12%) e *tccp/tccp2* (20%) ocorreram menos

frequentemente. Com relação aos grupos filogenéticos, aEPEC foram agrupadas em B1 (72%), A (20%), B2 (4%) e D (4%). Os isolados pertenciam a 11 sorotipos O:H, a maioria dos quais previamente associados à infecção em humanos, e três (O1:H8, O11:H21 e O125:H19) não descritos anteriormente em aEPEC. Todos os isolados foram aderentes às células HEp-2, sendo o fenótipo de adesão localizada-*like* (ALL) o mais comumente observado. Doze (48%) isolados expressaram enterohemolisina. Nossos resultados sugerem que ovinos podem ter um importante papel na disseminação de aEPEC potencialmente patogênicas para os humanos.

Palavras-chave: Ovinos, aEPEC, sorotipos, fatores de virulência

1. Introdução

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é uma das principais causas de diarreia, principalmente em crianças, em várias regiões do mundo (Nataro e Kaper, 1998). Esta classe de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) é caracterizada pela capacidade de induzir lesões *attaching and effacing* (A/E) no epitélio intestinal e não produzir toxinas Shiga (Kaper, 1996). EPEC são ainda subdivididas em dois distintos grupos, EPEC típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC), diferenciados com base na presença do plasmídeo *EPEC adherence factor* (EAF), o qual codifica a fimbria *bundle-forming pilus* (BFP), encontrado apenas em tEPEC (Kaper, 1996).

A ilha de patogenicidade (PAI) cromossomal denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) contém os genes associados à formação da lesão A/E, dentre os quais *eae* e *tir*, responsáveis por codificar a proteína de membrana externa intimina e seu receptor translocado Tir, respectivamente (Croxen e Finlay, 2010). Baseado no polimorfismo do gene *eae*, cerca de 34 tipos e subtipos de intimina têm sido descritos (Blanco et al., 2006; Horcajo et al., 2011).

aEPEC e tEPEC diferem significativamente com relação às propriedades genóticas e fenóticas (Trabulsi et al., 2002). Estudos epidemiológicos indicam também que aEPEC são mais prevalentes do que tEPEC em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil (Hernandes et al., 2009).

Além de ocorrer em humanos, uma grande variedade de sorotipos de aEPEC tem sido isolada de diferentes espécies de animais (Krause et al., 2005). Alguns

estudos sugerem que possa ocorrer a transmissão de cepas de aEPEC entre humanos e animais, evidenciando um possível potencial zoonótico deste patótipo (Moura et al., 2009; Horcajo et al., 2011). No entanto, mais estudos tornam-se necessários para o entendimento do papel desempenhado pelo reservatório animal na epidemiologia de aEPEC.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar a prevalência e caracterizar cepas de aEPEC isoladas de ovinos no Estado do Paraná, Brasil.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras fecais, cultivo e identificação bioquímica de E. coli

Durante o período de abril a setembro de 2010, foram coletadas amostras fecais de 130 ovinos saudáveis (sem diarreia) com idades entre uma semana a oito anos. Os animais pertenciam a dez propriedades localizadas em quatro municípios (Arapongas, Londrina, Rolândia e Tamarana) no Estado do Paraná. As amostras foram semeadas em ágar MacConkey (Difco) e incubadas a 37°C por 24 h. Em média três colônias fermentadoras de lactose foram selecionadas do crescimento bacteriano e, aquelas identificadas bioquimicamente como *E. coli*, armazenadas a -20°C em caldo infusão de coração e cérebro (BHI; Himedia) contendo glicerol 20% (v/v).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA nº 33/10; processo nº 10449.2010.10) da Universidade Estadual de Londrina.

2.2. PCR multiplex para detecção de eae, stx1 e stx2

O DNA dos isolados foi extraído por fervura e utilizados na PCR multiplex para detecção dos genes *eae*, *stx1* e *stx2*, conforme descrito previamente (Paton e Paton, 1998).

2.3. Caracterização genotípica

Os isolados de EPEC foram testados quanto ao subtipo de intimina por PCR e sequenciamento do gene *eae*, de acordo com Blanco et al. (2006). Também foi investigado a presença dos genes *bfpA* (Gunzburg et al., 1995), *tir* (Ogura et al., 2007), *tccp* (Garmendia et al., 2005), *tccp2* (Whale et al., 2007), *ehxA* (Paton e Paton, 1998), *lpf_{O113}* (Doughty et al., 2002) e *iha* (Tarr et al., 2000).

2.4. Classificação filogenética dos isolados

PCR triplex foi utilizada para classificação dos isolados com relação aos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D, de acordo com Clermont et al. (2000).

2.5. Caracterização fenotípica

A determinação dos antígenos O e H foi realizada de acordo com Guinée et al. (1981), utilizando todos os antissoros O (O1-O185) e H (H1-H56) disponíveis. O teste de adesão em células HEP-2 foi realizado em 6 horas a 37°C, conforme descrito previamente (Cravioto et al., 1979). A produção de α -hemolisina e enterohemolisina foi investigada de acordo com Beutin et al. (1989).

3. Resultados

Das 130 amostras fecais analisadas, 25 (19,2%) apresentaram isolados com características genotípicas de EPEC por PCR (*eae*-positivo *stx*-negativo). A prevalência de EPEC nas propriedades variou de 0% a 42%, sendo que apenas animais com até 18 meses de idade foram positivos (Tabela 1).

De cada amostra fecal positiva, foi selecionado apenas um isolado EPEC, obtendo-se um total de 25 isolados, os quais foram posteriormente caracterizados (Tabela 2). Todos os isolados foram considerados aEPEC, uma vez que foram negativos para o gene *bfpA*. A frequência observada para os genes *ehxA*, *iha* e *lpf_{O113}* foram 60%, 20% e 88%, respectivamente.

Quatro subtipos de intimina foram verificados entre os 25 isolados de aEPEC: *eae-β1* (15 isolados), *eae-θ1* (seis isolados), *eae-γ1* (um isolado) e *eae-α2* (um isolado), além de dois isolados nos quais não foi possível a determinação pela metodologia utilizada. Vinte e um (84%) isolados aEPEC apresentaram o gene *tirY-P* (fosforilado, tipo-EPEC), três (12%) portavam *tirS* (não fosforilado, tipo-EHEC) e um isolado não apresentou nenhum produto de PCR para *tir*, não sendo tipável (NT) para este genótipo. Os genes *tccp* e *tccp2* foram observados em um (4%) e quatro (16%) isolados, respectivamente. O tamanho dos amplicons de *tccp/tccp2* variaram de 750 a 1200 pb (Tabela 2). Com base na tipagem dos genes *tccp/tccp2* e *tir*, os 25 isolados aEPEC foram divididos em *tccp*-negativo/*tirY-P* (18 isolados), *tccp*-positivo/*tirY-P* (três isolados), *tccp*-positivo/*tirS* (dois isolados), *tccp*-negativo/*tirS* (um isolado) e *tccp*-negativo/*tirNT* (um isolado).

Em relação aos grupos filogenéticos, os isolados aEPEC foram distribuídos em B1 (72%), A (20%), B2 (4%) e D (4%). Foi possível verificar a ocorrência de isolados pertencendo a mais de um grupo filogenético em seis propriedades. Com exceção de uma propriedade, onde o grupo A foi mais frequente, em todas as demais os isolados pertenciam predominantemente a B1. Os grupos filogenéticos A, B1, B2 e D foram relacionados, respectivamente, aos subtipos de intimina θ1, β1, α2 e γ1 (Tabela 2).

Onze diferentes sorotipos (O:H) foram observados, três dos quais não descritos previamente em aEPEC (Tabela 2). No entanto, 64% dos isolados pertenciam a apenas quatro sorotipos: ONT:H21 (seis isolados), O2:H40 (quatro isolados), O70:H11 e O177:H11 (três isolados cada). Interessantemente, 60% dos isolados apresentaram os antígenos flagelares H11 ou H21. Embora o sorotipo ONT:H21 tenha sido o mais prevalente em termos absolutos, O2:H40 ocorreu em um maior número de propriedades, sendo detectado em animais pertencentes a três diferentes rebanhos. De um modo geral, aEPEC de mesmo sorotipo também apresentavam o mesmo subtipo de intimina e pertenciam ao mesmo grupo filogenético.

No teste de interação com culturas de células HEp-2, verificou-se que todos os isolados aEPEC foram aderentes, sendo o padrão localizado-*like* (ALL) o mais frequentemente observado, apresentado por 15 (60%) isolados, três dos quais expressavam simultaneamente outro fenótipo de adesão. Adesão agregativa (AA) e difusa (AD), além de padrões indefinidos (IND) também foram identificados. Não

foram observadas associações entre os sorotipos, tipos de intimina e fenótipos de adesão. Com relação à produção de hemolisinas, 12 (48%) isolados expressaram enterohemolisina (Ehly) e α -hemolisina não foi detectada.

4. Discussão

No presente estudo, EPEC foram isoladas de 19,2% dos ovinos analisados, resultados semelhantes àqueles reportados no Reino Unido (Aktan et al., 2004) e Alemanha (Krause et al., 2005). Em estudo similar conduzido no Estado de São Paulo, EPEC foram isoladas em apenas 3% dos ovinos examinados (Vettorato et al., 2009). Frequências mais baixas (11%) foram também encontradas na Índia (Wani et al., 2009). Em contraste, Fröhlicher et al. (2008) detectaram EPEC em mais de 50% dos ovinos estudados na Suíça. As distintas prevalências de EPEC nestes estudos podem ser devido a diferenças geográficas, características do rebanho e/ou metodologia aplicada, o que de certa forma limita comparações entre esses resultados.

EPEC foram isoladas exclusivamente dos animais mais jovens, com até 18 meses de idade. Cortés et al. (2005) observaram resultados semelhantes em caprinos na Espanha e sugerem que EPEC seja componente natural da microbiota intestinal de animais mais jovens. A proximidade com caprinos permite-nos extrapolar que o mesmo possa ocorrer em ovinos.

Todos os 25 isolados foram negativos para o gene *bfpA*, sendo portanto designados como aEPEC. Estes dados reforçam que tEPEC não são comumente isoladas de animais, e que os humanos constituem o único reservatório deste patotipo (Trabulsi et al., 2002).

De modo geral, uma grande diversidade de genótipos e fenótipos foram observados entre as aEPEC neste estudo, reafirmando a heterogeneidade apresentada por este patotipo quanto às propriedades de virulência (Abe et al., 2009). aEPEC geralmente apresentam fatores de virulência associados a outros patotipos de DEC, tais como *ehxA*, *iha* e *lpf_{O113}* (Scaletsky et al., 2009), presentes em 60%, 20% e 88% de nossos isolados.

Intimina- β 1 e θ 1 foram as mais prevalentes entre os isolados de aEPEC, resultado este condizente com outros estudos que relatam o predomínio destes

subtipos de intimina em aEPEC de ovinos (Krause et al., 2005; Frohlicher et al., 2008) e também de humanos com diarreia (Blanco et al., 2006; Kozub-Witkowski et al., 2008).

aEPEC podem utilizar diferentes mecanismos para induzir a formação de pedestais nos enterócitos, uma das características da lesão A/E (Frankel and Phillips, 2008). A tipagem dos genes *tccp/tccp2* e *tir* indicam que a maioria dos isolados aEPEC deste estudo podem utilizar a via dependente da fosforilação da tirosina 474 (Y474) de Tir para indução do fenótipo A/E. Em contraste, a ocorrência de três isolados com o genótipo *tccp2*-positivo/*tirY-P* sugere que estes possam utilizar também a via TccP2, esta última independente da fosforilação de Tir. No entanto, mais estudos são necessários para verificar se a utilização de mais de uma via pode conferir alguma vantagem a aEPEC na infecção de humanos e/ou na colonização do reservatório animal.

Os isolados de aEPEC pertenciam principalmente ao grupo filogenético B1 (72%) e, em menor proporção, A (20%), B2 (4%) e D (4%). Esta heterogeneidade filogenética é também documentada por Afset et al. (2008), em estudo com cepas de aEPEC isoladas de crianças com e sem diarreia na Noruega. Este mesmo estudo indica uma possível correlação entre o grupo B1 e diarreia. As associações entre subtipo de intimina e grupo filogenético (θ 1-A, β 1-B1, α 2-B2 e γ 1-D), observadas neste estudo, também têm sido descrita previamente em aEPEC (Tramuta et al., 2008).

Um total de 11 sorotipos foram observados, oito destes previamente descritos em cepas de aEPEC isoladas de humanos (Tabela 2). Mais de 200 sorotipos têm sido identificados em aEPEC (Hernandes et al., 2009), no entanto, para nosso conhecimento, esta é a primeira descrição dos sorotipos O1:H8, O11:H21 e O125:H19 neste patotipo. A ocorrência de isolados pertencendo a sorotipos associados à *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), tais como O145:H- e O146:H21, sugere que algumas cepas de aEPEC podem, na verdade, ser EHEC que perderam os genes *stx* durante a passagem pelo trato intestinal (Bielaszewska et al., 2008) ou nos subcultivos (Joris et al., 2011).

Todos os isolados foram aderentes a células HEp-2, sendo diferentes fenótipos de adesão observados, onde o padrão ALL foi o mais frequentemente expresso. A diversidade de padrões de adesão *in vitro* observados em aEPEC, bem como o predomínio do fenótipo ALL neste patotipo, também tem sido documentado

previamente por outros autores (Pelayo et al., 1999; Gomes et al., 2004; Abe et al., 2009).

aEPEC tem sido frequentemente isolada de humanos com diarreia em muitos países, incluindo o Brasil (Gomes et al., 2004; Tennant et al., 2009; Nunes et al., 2012). Há evidências que a diarreia causada por aEPEC pode ser considerada uma zoonose, uma vez que alta similaridade entre cepas de humanos e animais têm sido demonstrada com base em análises filogenéticas e perfis de virulência (Moura et al., 2009; Horcajo et al., 2011).

Desse modo, a ocorrência de aEPEC em animais utilizados para a produção de alimentos, como os ovinos, pode representar um risco à população, já que este patótipo também têm sido detectado em alimentos de origem animal (Kagambèga et al., 2012), assim como surtos de diarreia associados ao consumo de alimentos contaminados por aEPEC têm sido descritos (Hedberg et al., 1997; Wedley et al., 2012).

5. Conclusão

Em resumo, aEPEC com características genotípicas e fenotípicas semelhantes àquelas de cepas isoladas de humanos com diarreia foram obtidas de ovinos saudáveis. Estes resultados sugerem que ovinos representam um importante reservatório para cepas de aEPEC potencialmente patogênicas a humanos.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Dr. Agostinho Ludovico pela contribuição na coleta das amostras, ao Laboratório de Virologia (Universidade Estadual de Londrina) pelo fornecimento das culturas de células HEp-2 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências

- Abe, C.M., Blanco, M., Dhahi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Franzolin, M.R., Taddei, C.R., Piazza, R.M.F., Martinez, M.B., Elias, W.P., 2009. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*(+) EAFnegative *stx*(-) genetic profile. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 64, 357-365.
- Afset, J.E., Anderssen, E., Bruant, G., Harel, J., Wieler, L., Bergh, K., 2008. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2280–2290.
- Aktan, I., Sprigings, K.A., La Ragione, R.M., Faulkner, L.M., Paiba, G.A., Woodward, M.J., 2004. Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Vet. Microbiol.* 102, 43–53.
- Beutin, L., Montenegro, M.A., Ørskov, I., Ørskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., 1989. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2559-2564.
- Bielaszewska, M., Middendorf, B., Köck, R., Friedrich, A.W., Fruth, A., Karch, H., Schmidt, M.A., Mellmann, A., 2008. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin. Infect. Dis.* 47, 208–217.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Alonso, M.P., Mora, A., Coira, M.A., Madrid, C., Juárez, A., Bernárdez, M.I., González, E.A., Blanco, J., 2006. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int. Microbiol.* 9, 103–110.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558.
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Dhahi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Orden, J.A., 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli*

and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Vet. Microbiol.* 110, 67–76.

Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3, 95–99.

Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.

Doughty, S., Sloan, J., Bennet-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E., 2002. Identification of a novel fimbrial gene related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 70, 6761–6769.

Frankel, G., Phillips, A.D., 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell. Microbiol.* 10, 549–556.

Fröhlicher, E., Krause, G., Zweifel, C., Beutin, L., Stephan, R., 2008. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiology* 8, 144.

Garmendia, J., Ren, Z., Tennant, S., Vieira, M.A.M., Chong, Y., Whale, A., 2005. Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5715–5720.

Gomes, A.T., Irino, K., Girão, D.M., Girão, V.B.C., Guth, B.E.C., Vaz, T.M.I., Moreira, F.C., Chinarelli, S.H., Vieira, M.A.M., 2004. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1851–1855.

Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 137–149.

Guinée, P.A.M., Jansen, H.W., Wadstroöm, T., Sellwood, R., 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: De Leeww, P.W., Guinée, P.A.M. (Eds.), *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science*, vol. 13. Martinus Nijhoff, Hague, The Netherlands, pp. 126–162.

- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., Riley, L.W., 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR – bases of the detection of the bundle – forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1375-1377.
- Hedberg, C.W., Savarino, S.J., Besser, J.M., Paulus, C.J., Thelen, V.M., Myers, L.J., Cameron, D.N., Barrett, T.J., Kaper, J.B., Osterholm, M.T., 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 176, 1625–1628.
- Horcajo, P., Domínguez-Bernal, G., de la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., López, C., Puentes, B., Alonso, M.P., Blanco, J., Orden, J.A., 2011. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. *Vet. Microbiol.* 155, 341-348.
- Joris, M.A., Verstraete, K., De Reu, K., De Zutter, L., 2011. Loss of *vtx* genes after the first subcultivation step of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and non-O157 during isolation from naturally contaminated fecal samples. *Toxins.* 3, 672-677.
- Kaper, J. B., 1996. Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* 27, 130-133.
- Kagambèga, A., Martikainen, O., Lienemann, T., Siitonen, A., Traoré, A.S., Barro, N., Haukka, K., 2012. Diarrheogenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso. *Int. J. Food. Microbiol.* 153, 154-158.
- Kozub-Witkowski, E., Krause, G., Frankel, G., Kramer, D., Appel, B., Beutin, L., 2008. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J. Appl. Microbiol.* 104, 403–410.
- Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L., 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet. Microbiol.* 106, 87–95.
- Moura, R.A., Sircili, M.P., Leomil, L., Matte, M.H., Trabulsi, L.R., Elias, W.P., Irino, K., Pestana de Castro, A.F., 2009. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7399–7408.

- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142–201.
- Nunes, M.R., Magalhães, P.P., Macêdo, A.S., Franco, R.T., Penna, F.J., Mendes, E.N., 2012. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhea and controls in Teresina/PI, Brazil. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 106, 43-47.
- Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, S., Tennant, S., 2007. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. Infect. Immun. 75, 604-612.
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterisation of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J. Clin. Microbiol. 36, 598–602.
- Pelayo, J.S., Scaletsky, I.C., Pedroso, M.Z., Sperandio, V., Girón, J.A., Frankel, G., Trabulsi, L.R., 1999. Virulence properties of atypical EPEC strains. J. Med. Microbiol, 48, 41–49.
- Scaletsky, I.C.A., Aranda, K.R.S., Souza, T.B., Silva, N.P., Morais, M.B., 2009. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 47, 3756–3759.
- Tarr, P.I., Bilge, S.S., James, C., Vary, J.C., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, T.E., Besser, M.R., 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. Infect. Immun. 68, 1400–1407.
- Tennant, S.M., Tauschek, M., Azzopardi, K., Bigham, A., Bennett-Wood, V., Hartland, E.L., Qi, W., Whittam, T.S., Robins-Browne, R.M., 2009. Characterization of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. BMC Microbiol. 9, 117.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Gomes, T.A.T., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. 8, 508-513.
- Tramuta, C., Robino, P., Nebbia, P., 2008. Phylogenetic background of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from animals. Vet. Res. Common. 32, 433-437.

Vettorato, M.P., De Castro, A.F.P., Cergole-Novella, M.C., Camargo, F.L.L., Irino, K., Guth, B.E.C., 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy sheep of different populations in São Paulo, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 53–59.

Wani, S.A., Hussain, I., Fayaz, I., Mir, M.A., Nishikawa, Y., 2009. Subtype analysis of *stx1*, *stx2* and *eae* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. *Vet. J.* 182, 489-490.

Wedley, A.L., Elajnef, H.M., Fletcher, J.N., 2012. Characterization of a novel EAST-negative enteropathogenic *E. coli* strain implicated in a food-borne outbreak of diarrhea in adults. *APMIS*. Epub ahead of print.

Whale, A.D.; Hernandez, R.T.; Ooka, T., Beutin, L., Schüller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Viera, M.A.M., Ogura, Y., Krause, G., Phillips, A.D., Gomes, T.A.T.; Hayashi, T., Frankel, G., 2007. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2- a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* 153, 1743-1755.

Tabela 1 - Prevalência de EPEC nas propriedades e distribuição nos diferentes grupos etários.

Propriedade	EPEC (n°. animais positivos/n°. animais examinados)			Total (%)
	Idade (meses)			
	Até um	1 – 18	Acima de 18	
A	3/12	1/6	0/6	4/24 (16,6)
B	3/4	0/4	0/4	3/12 (25,0)
C	0/0	0/4	0/4	0/8 (0,0)
D	0/0	0/0	0/5	0/5 (0,0)
E	3/7	4/10	0/0	7/17 (41,2)
F	4/15	0/1	0/7	4/23 (17,4)
G	0/3	0/4	0/2	0/9 (0,0)
H	2/6	1/7	0/2	3/15 (20,0)
I	1/2	0/3	0/2	1/7 (14,3)
J	2/3	1/3	0/1	3/7 (42,8)
Total (%)	18/52 (34,6)	7/45 (15,5)	0/33 (0,0)	25/130 (19,2)

Tabela 2 - Características genotípicas e fenotípicas de aEPEC isoladas de ovinos no Estado do Paraná.

Propriedade	Animal	Sorotipo	Genes de virulência							Hem ^b	Ad ^c	GF ^d		
			<i>eae</i>	<i>bfpA</i>	<i>tir</i>	<i>tccp</i> (pb) ^a	<i>tccp2</i> (pb) ^a	<i>ehxA</i>	<i>iha</i>				<i>lpf</i> _{O113}	
A	AN9 [†]	O1:H8*	θ1	-	Y-P	-	-	+	-	+	Ehly	ALL	A	
	AN3 [†]	O2:H40**	θ1	-	Y-P	-	-	-	-	-	-	AA	A	
	AJ1 [†]	O2:H40	θ1	-	Y-P	-	-	+	-	+	-	ALL	A	
	AN4 [†]	O153:H7**	β1	-	Y-P	-	-	-	-	+	-	ALL	B1	
B	BN3 [†]	O11:H21*	NT	-	Y-P	-	-	+	+	+	Ehly	AA	B1	
	BN1 [†]	O177:H11**	β1	-	Y-P	-	-	+	+	+	Ehly	ALL	B1	
	BN2 [†]	O177:H11	β1	-	S	-	-	+	+	+	Ehly	ALL	B1	
E	EN2 [†]	O146:H21**	θ1	-	Y-P	-	-	-	-	+	-	ALL/AD	B1	
	EJ8 [‡]	O146:H21	θ1	-	Y-P	-	-	+	-	+	-	AD	B1	
	EJ6 [‡]	O177:H11	β1	-	Y-P	-	+	(750)	+	-	+	Ehly	ALL	B1
	EN1 [†]	ONT:H21**	β1	-	Y-P	-	-	+	-	+	Ehly	IND	B1	
	EN6 [†]	ONT:H21	β1	-	Y-P	-	-	-	-	+	-	AA/AD	B1	
	EJ7 [‡]	ONT:H21	β1	-	Y-P	-	-	+	-	+	-	ALL	B1	
	EJ9 [‡]	ONT:H21	β1	-	Y-P	-	-	+	-	+	Ehly	AA	B1	
F	FN15 [†]	O2:H40	θ1	-	Y-P	-	-	-	-	-	-	ALL	A	
	FN4 [†]	O70:H11**	β1	-	Y-P	-	-	+	-	+	Ehly	AA	B1	
	FN8 [†]	O70:H11	β1	-	NT	-	-	+	-	+	Ehly	ALL	B1	
	FN1 [†]	O125:H19*	α2	-	S	+	(1100)	-	-	+	-	ALL/AA	B2	
H	HN2 [†]	O2:H40	θ1	-	Y-P	-	-	-	-	-	-	IND	A	
	HJ6 [‡]	O70:H11	β1	-	Y-P	-	+	(750)	+	+	+	Ehly	ALL/AA	B1
	HN5 [†]	O88:H25**	β1	-	Y-P	-	-	-	-	+	-	AD	B1	
I	IN2 [†]	O153:H7	β1	-	Y-P	-	+	(750)	+	-	+	Ehly	ALL	B1
J	JJ4 [†]	O145:H-**	γ1	-	S	-	+	(1200)	+	+	+	Ehly	ALL	D
	JN1 [†]	ONT:H21	β1	-	Y-P	-	-	-	-	+	-	ALL	B1	
	JN3 [†]	ONT:H21	β1	-	Y-P	-	-	-	-	+	-	IND	B1	

[†] Animais com até um mês de idade

[‡] Animais com um a 18 meses de idade

NT: não tipável; H-: não móvel

* Sorotipos não descritos previamente em aEPEC

** Sorotipos previamente descritos em cepas de aEPEC isoladas de humanos (Bielaszewska et al., 2008; Abe et al., 2009; Hernandez et al., 2009)

^a Tamanho do fragmento (pares de bases)

^b Produção de hemolisinas – Ehly (enterohemolisina)

^c Adesão a células HEp-2 em 6 h – AA (adesão agregativa); AD (adesão difusa); ALL (adesão localizada-like); IND (padrão indefinido); ALL/AA, ALL/AD, AA/AD (padrões mistos)

^d Grupo filogenético

5 CONCLUSÕES

De modo geral, uma grande variedade de sorotipos e perfis de virulência foi observado em STEC e aEPEC isoladas de ovinos, muitos dos quais associados a doenças em humanos. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato da ocorrência do sorotipo O103:H2 em STEC de origem animal no Brasil. Portanto, estes resultados confirmam que ovinos são um importante reservatório de STEC e aEPEC, podendo atuar como fontes de infecção em humanos em nosso meio.