

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E
CARACTERIZAÇÃO PATOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Escherichia coli PATOGÊNICOS E COMENSAIS DE
SUÍNOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lilian Kolling

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E
CARACTERIZAÇÃO PATOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Escherichia coli PATOGÊNICOS E COMENSAIS DE SUÍNOS
DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

por

Lilian Kolling

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof. Dr. Agueda Castagna de Vargas

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO
PATOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICOS E
COMENSAIS DE SUÍNOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

elaborada por
Lilian Kolling

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Agueda Castagna de Vargas, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Dr. (UFRGS)

Sônia de Ávila Botton, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 18 de fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e saúde e à minha família, em especial meus pais Pedro e Rose e minha irmã Carine pelo apoio, carinho, conselhos e exemplo que são para mim.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização deste projeto.

À professora Agueda, pela orientação e ensinamentos recebidos durante o período de execução deste trabalho.

À Cris, pela amizade, apoio e incentivo sempre. Pelas noites de sono perdidas lendo e corrigindo a dissertação. Obrigada pela paciência e orientação!

Ao professor Mateus que desde o início da graduação tem sido modelo profissional, mestre e amigo, obrigada pelo apoio e sugestões na elaboração deste projeto.

Às amigas, Fer, Soninha, Jacke, Leti e Luana, pela amizade, convivência e companheirismo durante esses dois anos. Além do auxílio durante a execução do projeto e correções do manuscrito.

À Cari, que muito mais que amiga, foi uma irmã, estando junto nos momentos bons e também nos mais difíceis. Obrigada pela lealdade!

Ao meu noivo Gil, que durante esses dois anos foi meu companheiro, amigo e conselheiro, me incentivando nos momentos de maior dificuldade. Obrigada pela paciência e carinho!

Aos amigos Beto e Nice, que me receberam como filha, sempre me incentivando, aos quais considero como minha família.

A todos Muito Obrigada!!!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO PATOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICOS E COMENSAIS DE SUÍNOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL

AUTORA: LILIAN KOLLING

ORIENTADOR: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de fevereiro de 2009.

O presente estudo tem por objetivo avaliar a presença de diferentes fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* intestinais e extra-intestinais provenientes de suínos da região sul do Brasil pela PCR multiplex (mPCR) e classificá-los nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D pela detecção de três marcadores de patogenicidade: *chuA*, *yjaA* e um fragmento anônimo de DNA designado TSPE4.C2. Foram analisadas 152 amostras de diferentes origens: urina (70), fezes (35), intestino delgado (35) e tecidos (12). A mPCR foi realizada para a patotipificação dos isolados e uma PCR com os marcadores acima citados, para a classificação dos grupos filogenéticos. Setenta e sete (51%) isolados testados pela mPCR apresentaram-se positivos para ao menos algum fator de virulência, enquanto a caracterização filogenética dos isolados revelou 21 (14%) isolados no grupo A, 65 (42%) em B1, 19 (13%) em B2 e 47 (31%) no grupo D. Quatorze (20%) isolados de urina foram caracterizados como UPEC; nove (12,8%) apresentaram fatores de UPEC e ETEC simultaneamente e quatro (5,8%) foram classificados como ETEC. Na classificação filogenética, os grupos de maior ocorrência foram D (45,8%) e B1 (32,8%). Das amostras de fezes analisadas, 25 (71,4%) demonstraram fatores de virulência característicos do patotipo ETEC. Filogeneticamente, o grupo de maior ocorrência foi o B1 com 21 (60%) amostras, seguido de B2 com seis (17,2%), grupo A com cinco (14,2%) e grupo D com três (8,6%) isolados. Para as amostras de intestino delgado, 20 (57,2%) foram caracterizadas como ETEC. Pela filogenia, 23 (65,6%) isolados classificaram-se nos grupos A ou B1, sendo 51,4% deles neste último e seis (17,2%) foram alocados em iguais proporções nos grupos B2 ou D. Seis isolados de tecidos (50%) foram qualificados como ETEC. Em relação à classificação filogenética, seis (50%) amostras alocaram-se no grupo D, seguidas dos grupos A e B1, com três (25%) amostras em cada grupo. Para os isolados testados, a técnica de análise de filogenia mostrou-se eficiente, podendo ser incluída na rotina laboratorial para levantamento epidemiológico de amostras intestinais e extra-intestinais suínas, permitindo diferenciar assim, isolados patogênicos e não patogênicos, bem como auxiliar na seleção de cepas para confecção de vacinas.

Palavras-chave: Filogenia; Patotipificação; *E. coli*.

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PHYLOGENETIC CLASSIFICATION AND PATHOTYPE CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC AND COMMENSAL *Escherichia coli* ISOLATED OF SWINE FROM SOUTHERN BRAZIL

AUTORA: LILIAN KOLLING

ORIENTADOR: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de fevereiro de 2009.

The aim of the study was to evaluate the presence of different virulence factors in intestinal and extra-intestinal *Escherichia coli* swine isolates from Southern Brazil by multiplex PCR (mPCR) and classify them in A, B1, B2 and D phylogenetic groups based on three pathogenicity markers: *chuA*, *yjaA* and a DNA anonymous fragment designated TSPE4.C2. Were analyzed 152 samples from different origins: urine (70), feces (35), small intestine (35) and tissues (12). The mPCR was carried out to pathotypification of the isolates and a PCR with the pathogenicity markers, to classify in phylogenetic groups. Seventy seven (51%) isolates when tested by mPCR were positive to at least one of the virulence factors, while the phylogenetic characterization of the isolates showed 21 (14%) isolates in A, 65 (42%) in B1, 19 (13%) in B2 and 47 (31%) in D group. Fourteen (20%) urine isolates were characterized as UPEC; nine (12.8%) presented UPEC and ETEC factors simultaneously and four (5.8%) were classified as ETEC. In the phylogenetic classification, the groups of major occurrence were D (45.8%) and B1 (32.8%). Of the analyzed feces samples, 25 (71.4%) demonstrated virulence factors characteristic of pathotype ETEC. Phylogenetically, the group of higher incidence was B1 with 21 (60%) samples, followed by B2 with six (17.2%), group A with five (14.2%) and group D with three (8.6%) isolates. For the small intestine samples, 20 (57.2%) were characterized as ETEC. By the phylogeny, 23 (65.6%) isolates were classified in groups A or B1, among them 51.4% belonged to B1 and six (17.2%) were located in equal percentage in groups B2 and D. Six tissue isolates (50%) were qualified as ETEC. In regards to the phylogenetic classification, six (50%) samples were located in group D, followed by A and B1, with three (50%) samples in each group. For the tested isolates, the phylogenetic analysis demonstrated to be efficient, and it may be included in laboratorial routine for epidemiologic studies of the intestinal and extra intestinal swine samples, allowing the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates, as well as helping in the strains selection for the vaccine production.

Key words: Phylogeny; Pathotypification; *E. coli*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1 – Phylogenetic classification of urine, feces, small intestine and tissue samples in comparison with virulence factors presence or absence by Multiplex PCR.....	36
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos pela amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA TSPE4. C2. Fonte: Clermont et al., 2000 23

CAPÍTULO 1

FIGURE 2 - Pathotype characterization and virulence factors of urine (2A), feces (2B), small intestine (2C) and tissues (2D) of *E. coli* isolates from swine..... 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPc - Adenosina monofosfato-cíclica
- BPF – *Bundle forming pillus*
- CNF – Fator citotóxico necrotizante
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EAST – Enteroagregativa ST
- EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
- EspS – EPEC *secreted proteins*
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
- GMPc – Guanosina monofosfato cíclica
- HAMR – Hemaglutinação não dependente da ausência de manose
- HAMS – Hemaglutinação dependente da ausência de manose
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- LEE – *Locus enterocyte effacement*
- LT – Exotoxina termolábil
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- ST – Exotoxina termoestável
- STEC – *Escherichia coli* shiga toxigênica
- TIR – Receptor translocado de intimina
- UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica
- VETEC – *Escherichia coli* verotoxigênica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Infecção por <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	14
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	16
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> Shiga toxigênica ou Verotoxigênica (STEC/VETEC).....	18
2.1.4 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	18
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	19
2.1.6 <i>Escherichia coli</i> Uropatogênica (UPEC).....	20
2.2 Diagnóstico de infecções causadas por <i>E. coli</i>	20
2.3 Grupos filogenéticos em <i>Escherichia coli</i>	22
3 CAPÍTULO 1	25
Phylogenetic and Pathotype analysis of <i>Escherichia coli</i> swine isolates from Southern of Brazil.....	26
Abstract.....	26
Introduction.....	27
Material e Methods.....	28
Results.....	29
Discussion.....	30
Sources and manufacturers.....	32
References.....	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6 APÊNDICE	47

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade de grande importância para a economia mundial. A produção de suínos cresceu 19,8% nos últimos três anos, passando de 26,4 milhões de cabeças em 2004, para 31,8 milhões em 2007. O Brasil é o quarto país em produção e o sexto em consumo de produtos derivados de suínos (ABIPECS, 2008). O crescimento do país como exportador da carne suína está diretamente relacionado aos altos índices de produtividade e qualidade do produto, com a adequação às exigências dos diferentes mercados importadores. Nesse sentido, a suinocultura brasileira tem sofrido várias modificações tecnológicas, com intensificação da produção e aperfeiçoamento da genética dos reprodutores. Entretanto, nesse sistema os animais têm sido submetidos a condições de estresse, o que pode aumentar os índices de ocorrência de diferentes enfermidades entéricas, respiratórias e urinárias (PORK WORLD, 2008).

Entre os principais patógenos de importância na suinocultura destaca-se a *Escherichia coli*, bactéria que coloniza diferentes hospedeiros e é amplamente distribuída no meio ambiente. Este microrganismo apresenta diversos patótipos, caracterizados pela presença de diferentes fatores de virulência codificados por genes específicos (TENG et al., 2004). Os principais patótipos de *E. coli* causadores de diferentes síndromes em suínos são: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shiga toxigênica ou verotoxigênica e *E. coli* enterohemorrágica (STEC ou VETEC e EHEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (CHOI et al., 2001, BRITO et al., 2004, GYLES; FAIRBROTHER, 2004). A patotipificação de *E. coli* pela determinação de fatores de virulência como exotoxinas, hemolisinas, sideróforos, adesinas e endotoxina presente na parede celular, pode ser realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Além disso, o microrganismo apresenta também diversos sorotipos de acordo com a presença de diferentes antígenos somáticos, capsulares e fimbriais, os quais podem ser determinados pela utilização de anti-soros. No entanto, a tipificação sorológica da bactéria é limitada, pois somente algumas cepas apresentam anti-soros disponíveis (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999).

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra-intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos

(JOHNSON et al., 2001). As análises filogenéticas têm mostrado que cepas desta bactéria podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie, sendo: A, B1, B2 e D (CLERMONT et al., 2000). As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Por outro lado, as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1 (HERZER et al., 1990; LECOINTRE et al., 1998; SABATÉ et al., 2006).

Cepas extra-intestinais patogênicas e comensais de *E. coli* diferem de acordo com os fatores de virulência, expressos por genes geralmente agrupados em ilhas de patogenicidade, proporcionando um mecanismo de transferência horizontal coordenada desses genes de virulência (SHERLEY et al., 2004).

Três candidatos a marcadores de patogenicidade têm sido estudados: *chuA*, um gene necessário para o heme transporte em *E. coli* enterohemorrágica (0157:H7) (MILLS; PAYNE, 1995; BONACORSI et al., 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida (BLATTNER et al., 1997) e um fragmento de DNA designado TSPE4.C2 (BONACORSI et al., 2000) .

A classificação das cepas patogênicas ou comensais pode ser realizada por enzimas multilocus (SELANDER et al., 1986; HERZER, et al., 1990) ou ribotipagem (BINGEN et al., 1994). No entanto, estas técnicas são complexas, laboriosas e necessitam de um banco com diferentes cepas para comparação. A PCR para grupos filogenéticos é um método simples e rápido para classificação dos isolados de *E. coli* nos grupos filogenéticos pela detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2 (CLERMONT et al., 2000).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a presença de diferentes fatores de virulência em isolados de *E. coli* intestinais e extra-intestinais provenientes de urina, fezes, intestino delgado e tecidos de suínos oriundos da região sul do Brasil, classificá-los filogeneticamente, além de comparar os resultados da classificação patotípica e filogenética desses isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção por *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria classificada na família *Enterobacteriaceae*, que morfológicamente caracteriza-se como microrganismo bacilar, gram-negativo, anaeróbico facultativo, apresentando flagelos peritríquios e cápsula. É comensal do intestino da maioria dos animais, incluindo o homem. Contudo, em casos de baixa imunidade do hospedeiro, até mesmo cepas não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (DRASAR; HILL, 1974). A principal fonte de contaminação para suínos suscetíveis são as fezes desses animais. Uma vez eliminada no meio ambiente, a bactéria pode sobreviver por até 11 semanas quando em condições ideais de temperatura e umidade (BURROWS; RANKIN, 1970; BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). Além disso, esta bactéria é um dos principais patógenos isolados de infecções do trato urinário, causando significativa porcentagem de morte e descarte de fêmeas suínas (BRITO et al., 1999).

A ocorrência da enfermidade está associada a uma série de fatores como características individuais dos animais, má alimentação e manejo inadequado (BRITO et al., 2004), além da patogenicidade da cepa envolvida (STRAW et al., 1999; GYLES; FAIRBROTHER, 2004). Duas síndromes principais podem resultar da infecção com diferentes patótipos, determinadas de acordo com o padrão de expressão dos genes de virulência, sendo elas doença entérica e infecção do trato urinário. Sabe-se que estes fatores podem estar localizados em plasmídeos, possibilitando sua transferência entre isolados, o que dificulta, muitas vezes, a sua classificação (RUSSO; JOHNSON et al., 2000).

Diversos fatores de virulência diferenciam isolados de *E. coli* intestinais e extra-intestinais patogênicos dos comensais. Estes são expressos por genes que podem estar alocados em ilhas de patogenicidade, sendo responsáveis pela transferência horizontal dos fatores de virulência entre as cepas via plasmídeos (SHERLEY et al., 2004). Plasmídeos são elementos genéticos móveis que podem gerar cópias independentemente da duplicação do cromossomo no interior de células vivas (GRIFFITHS et al., 1995).

A aquisição desses genes de virulência pode ocorrer via conjugação, envolvendo a transferência de DNA a partir de células que possuem pili sexual ou pili F. Esta estrutura

aproxima a célula doadora e receptora possibilitando a passagem de plasmídeos conjugativos, como de segmentos de DNA cromossomal (SUMMERS et al., 1996). Os integrons são elementos de DNA móveis que podem capturar e carrear genes e os transposons são seqüências de DNA de replicação e transmissão integradas em um genoma (SHERLEY et al., 2004). Outra forma de aquisição de genes de virulência é via transformação, processo pelo qual o DNA pode ser absorvido a partir do ambiente onde a bactéria se encontra. O DNA pode persistir por muitas horas ou dias no meio ambiente e ser incorporado por microrganismos aptos. A transformação natural envolve a competência da bactéria receptora, ou seja, permissividade à entrada do DNA exógeno, sendo que esta capacidade já foi comprovada, em condições naturais, para *E. coli* (BAUR et al., 1996).

A tipificação sorológica é fundamental para caracterização da espécie. Este agente é classificado em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica; antígenos somáticos (O) para os sorogrupos e antígenos flagelares (H) para os sorotipos. Pode, ainda, expressar antígenos capsulares (K) e fimbriais (F), que são importantes na patogênese (NATARO & KAPER, 1998). Para tanto, são utilizados anti-soros; contudo estes estão disponíveis apenas para um grupo reduzido de cepas (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). Assim, a detecção de fatores de virulência que são específicos a cada patotipo é importante para identificação e classificação de *E. coli* (GYLES et al., 2004).

A presença de um ou mais genes de virulência define um determinado isolado como patogênico (PITOUT et al., 2005). *E. coli* pode ser genotipificada pela caracterização molecular de fatores como a endotoxina presente na parede celular, exotoxinas, associadas à perda de líquidos no intestino, hemolisinas, sideróforos e adesinas (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). Os principais patotipos responsáveis por causar enfermidades em suínos são *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Shiga toxigênica ou verotoxigênica (STEC ou VETEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (BRITO et al., 2004; GYLES; FAIRBROTHER, 2004). As infecções do trato urinário são comumente causadas por *E. coli* extra-intestinais, especialmente UPEC (KAPER et al., 2004).

2.1.1 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

E. coli ETEC caracteriza-se por ocasionar uma enfermidade que provoca diarreia neonatal principalmente em animais com idade entre zero e quatro dias. Esta bactéria adere-se à mucosa do intestino delgado de leitões graças à presença de adesinas fimbriais, tais como F4, F5, F6, F18 e F41, que são responsáveis por sua ligação aos receptores específicos nas células epiteliais com posterior produção de exotoxinas termoestáveis (STa e STb) e termolábil (LT), além de uma toxina conhecida como EAST (STRAW et al., 1999)

Dentre as fimbrias, a F4 é uma das principais encontradas em isolados de diarreia (COSTA et al., 2008) e o gene responsável por sua expressão localiza-se no mesmo plasmídeo que alberga o gene da hemolisina. Por este motivo, a maioria das cepas patogênicas de *E. coli* apresentam hemólise em meios de cultura como o ágar sangue. Apesar da importância da presença de fimbrias para a virulência dos isolados e determinação da doença, existem animais geneticamente resistentes à adesão por estas cepas, uma vez que não possuem receptores fimbriais nas células intestinais (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007)

As toxinas LT são intimamente relacionadas em estrutura e função à enterotoxina da cólera, expressa pelo *Vibrio cholerae* (SIXMA et al., 1993). São divididas em dois grupos, sendo LT-I presente em cepas de *E. coli* patogênicas tanto para animais como para humanos e LT-II encontrada principalmente em cepas isoladas de animais e, raramente, em humanos. As toxinas ST possuem classes que diferem em estrutura e mecanismo de ação, sendo elas STa e STb, responsáveis por danos histológicos no epitélio intestinal devido à perda das vilosidades ou atrofia parcial (CHAO; DREYFUS, 1997).

STa é um peptídeo com peso molecular de 2kDa. Apresenta duas variantes, designadas STaP (ST suína) e STaH (ST humana), sendo que as duas podem ser encontradas em amostras de humanos (NATARO; KAPPER, 1998). STb foi inicialmente associada a cepas de ETEC isoladas de suínos, no entanto, algumas cepas humanas também podem expressá-la. É um peptídeo com peso molecular de 5,1kDa. A sequência da proteína STb não apresenta homologia com STa (ARRIAGA et al., 1995). Diferentemente da STa, a STb induz a danos no epitélio intestinal como perda das células epiteliais e atrofia parcial das vilosidades (CHAO; DREYFUS, 1997).

A ligação de STa a guanilil ciclase estimula a atividade da enzima guanilato ciclase, levando a um aumento dos níveis intracelulares de GMPc (CRANE et al., 1992), enquanto a toxina LT ativa a enzima adenilato ciclase e estimula a produção de AMPc. (STROHL et al., 2004). A presença de GMPc e AMPc induz uma hipersecreção de íons cloreto e água das células, impedindo a absorção de sódio. Com isso, ocorre uma alteração no balanço hidro-

eletrolítico nos enterócitos, provocando a perda de água e eletrólitos pelo organismo, o que resulta em diarreia, severa desidratação e acidose metabólica, levando a altos índices de mortalidade dos animais acometidos pela doença e prejuízos econômicos nas granjas (HENTON; HUNTER, 1994). A toxina STb não estimula secreção intracelular de GMPc, embora estimule um aumento de cálcio intracelular a partir de fontes extracelulares (DREYFUS et al., 1993).

A toxina EAST foi identificada em amostras de *E. coli* provenientes de suínos com diarreia, sendo comumente encontrada em isolados ETEC positivos para as fimbrias F4 e F18, além da toxina STx2 de animais apresentando a doença do edema, que geralmente está relacionada ao patotipo STEC. O mecanismo de virulência desta toxina é semelhante ao da toxina STa (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

A colibacilose neonatal é a enfermidade normalmente associada com a infecção por ETEC e ocorre pela ingestão de bactérias de origem materna e ambiental, pela ausência das defesas naturais e presença de receptores para as fimbrias no intestino dos leitões (GYLES; FAIRBROTHER, 2004). Além disso, a inadequada ingestão do colostro e a deficiência da imunidade materna, principalmente em fêmeas suínas primíparas, são considerados importantes fatores predisponentes (HENTON; HUNTER, 1994).

Esta enfermidade provoca desde uma diarreia branda sem evidências de desidratação até sinais caracterizados por fezes aquosas e amareladas com severa desidratação. Em casos severos, pode ocorrer a perda de 30 a 40% do peso corporal ou ainda a morte por choque, quando leitões aparentemente saudáveis morrem repentinamente ou declinam rapidamente, apresentando sinais de cianose nas extremidades (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999).

2.1.2 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

E. coli EPEC é membro de um grupo de microrganismos patogênicos que podem determinar sérios prejuízos econômicos devido à ocorrência de diarreias neonatais e pós-desmame associadas à má absorção de nutrientes (AN et al., 2000). No entanto, a prevalência desta enfermidade em suínos no Brasil é pouco relatada, tendo importância clínica em outras espécies como ruminantes, cães, macacos e humanos (BEAUDRY et al., 1996; SARIDAKIS et al., 1997; CARVALHO et al., 2003; NAKAZATO et al., 2004; TENG et al., 2004).

Cepas deste patotipo aderem-se às células do hospedeiro, causando uma lesão histopatológica denominada *attaching effacing* (AN *et al.*, 2000), sendo que os enterócitos são degenerados e ocorre inflamação da lâmina própria, principalmente no íleo. No entanto, o duodeno e o ceco são os locais onde ocorre a maior colonização (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999; AN *et al.*, 2000).

Os fatores de patogenicidade associados à lesão de *attaching effacing* são codificados por uma ilha de patogenicidade denominada *locus enterocyte effacement* (LEE), a qual se constitui num *cluster* de genes com 35 Kb (PERNA *et al.*, 1998). A LEE codifica importantes fatores para a aderência bacteriana, como a intimina, codificada pelo gene *eae*, bem como uma série de proteínas secretadas, as Esps (*EPEC secreted proteins*). Estas proteínas polimerizam e formam uma estrutura filamentosa semelhante a uma agulha. Por este sistema é injetado na célula hospedeira um receptor para intimina, proteína bacteriana responsável pela aderência às células hospedeiras, também presente na ilha de patogenicidade, denominado Tir (*translocated intimin receptor*), o qual auxilia na ligação da bactéria à célula hospedeira, promovendo rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto celular pela montagem de estruturas semelhantes a pedestais (AN *et al.*, 2000; CLEARY *et al.*, 2004). Dessa forma, as células intestinais perdem a capacidade absorptiva de nutrientes, observando-se degeneração localizada das microvilosidades e forte aderência da bactéria às células da membrana epitelial. (GYLES; FAIRBROTHER, 2004)

Várias adesinas têm sido estudadas como fatores de patogenicidade nas *E. coli* EPEC, porém a que tem demonstrado maior importância é a *Bundle forming pillus* (BFP). Esta fímbria, codificada por um plasmídeo (*EAF-EPEC Adherence Factor*) de cerca de 80Kb, tem se mostrado importante para a interação célula-célula e a formação da microcolônia, bem como para a dispersão das bactérias deste arranjo. Estudos apontam que esta fímbria é muito importante para adesão inicial da bactéria aos enterócitos (CLEARY *et al.*, 2004). Contudo, amostras desprovidas do plasmídeo EAF têm sido também isoladas de *E. coli* envolvidas em diarreias no homem (GIRÃO *et al.*, 1999). Cepas atípicas de EPEC, que possuem homólogos da LEE, mas que diferentemente das demais, não apresentam plasmídeos contendo os genes de aderência, têm demonstrado aderência difusa (GARTNER; SCHMIDT, 2004).

A diarreia causada por este patotipo é pouco severa e está associada a múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade, inflamação intestinal e conseqüentemente má absorção de nutrientes (NATARO; KAPER, 1998).

2.1.3 *Escherichia coli* Shiga toxigênica ou Verotoxigênica (STEC/VETEC)

Uma importante enfermidade, ocasionada por *E. coli* verotoxigênicas (VETEC ou STEC) em leitões recém desmamados é a doença do edema. Estes microrganismos demonstram uma alta relação com as EPEC. Ambas apresentam a LEE, entretanto a STEC possui *shiga* toxinas, sendo a STx2 especialmente importante para suínos. Esta toxina é encontrada como parte do genoma de um fago temperado, o qual se integra ao genoma da célula hospedeira sendo encontrado em diversos sorotipos de *E. coli* e em outros membros da família *Enterobacteriaceae* (DOUGAN et al., 2001; TOTH et al., 2003). A enfermidade ocorre quando cepas de *E. coli* STEC se aderem ao intestino delgado por meio de fimbrias F18a/b e se multiplicam, produzindo exotoxinas (*shiga* toxinas) que são absorvidas pela circulação sistêmica. Essas toxinas inativam a síntese protéica em células do endotélio vascular do intestino delgado, tecido subcutâneo e encéfalo. A lesão nas células endoteliais induz o aparecimento do edema e sinais nervosos característicos da enfermidade (HENTON; HUNTER, 1994).

2.1.4 *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)

E. coli EHEC compreende um grupo importante de patógenos entéricos zoonóticos, podendo em muitos casos determinar doença fatal. Os ruminantes são reservatórios frequentes da bactéria e as infecções humanas associam-se ao contato direto ou indireto com as fezes destes animais (NATARO; KAPER, 1998). Caracteriza-se pela produção de hemolisina, codificada pelo gene *HlyA* (SCHMIDT, 1994) e produção de *shiga like* toxina (SLT), codificada pelo gene *Stx1* ou *Stx2* (O'BRIEN; HOLMES, 1987). A citotoxina Shiga é prejudicial para uma variedade de células endoteliais e epiteliais, incluindo células do cólon e do íleo humanos. A STx 1 é idêntica à Shiga toxina da *Shigella dysenteriae* e a STx 2, por sua vez, apresenta 56% de homologia com a STx 1. A subunidade B, componente desta toxina, se liga à membrana glicolípídica dessas células, permitindo que a toxina seja internalizada por endocitose. A subunidade A tem atividade N-glicosidase, a qual retira um único resíduo de adenina do componente 28S do rRNA dos ribossomos eucarióticos. O resultado da inibição da síntese proteica leva à morte da célula intoxicada (GYLES et al., 2004).

Em humanos, a infecção por EHEC pode ocasionar a síndrome hemolítica urêmica, podendo apresentar taxa de mortalidade de até 12 % (GERBER et al. 2002; GARG et al. 2003). Esta doença ocorre quando as toxinas produzidas por *E. coli* são absorvidas pela circulação sistêmica. Caracteriza-se por trombocitopenia, anemia hemolítica e nefropatia (KARMALI et al., 1985).

Em suínos, a enfermidade geralmente ocorre entre cinco e 14 dias após o desmame (STRAW et al., 1999). A resistência natural à doença ocorre pela ausência de expressão de receptores (F18a/b) no intestino dos animais. Leitões nascidos de fêmeas primíparas têm maior predisposição devido à deficiência na transmissão da imunidade passiva (MOXLEY, 2000).

A morbidade é extremamente variável, geralmente entre 30% e 40%, porém pode chegar a 80%. A mortalidade média é de 50%, no entanto, em alguns casos atinge índices maiores que 90%. O curso da doença varia de quatro a 14 dias, podendo surgir e desaparecer subitamente (STRAW et al., 1999). Os sinais clínicos incluem incoordenação motora, cegueira, dispnéia, edema de pálpebras, paralisia, tremores, convulsões e movimentos de pedalagem, podendo alcançar altos índices de mortalidade.

2.1.5 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Cepas caracterizadas como EIEC apresentam características bioquímicas, genéticas e de patogenicidade semelhantes à *Shigella* sp. (BRENNER et al., 1973). Os mecanismos de patogenicidade deste patotipo ainda não estão completamente elucidados, contudo estudos demonstram que o microrganismo invade profundamente o epitélio do intestino, especialmente do cólon. Em seguida, atinge o sistema linfático, onde se multiplica ao mesmo tempo em que ocorre a morte de algumas células bacterianas e produção de endotoxinas.

Os fatores de virulência como cápsula, adesinas, sideróforos e α -hemolisina são importantes para a sobrevivência de cepas invasivas, que são responsáveis por causar colisepticemia. Ainda, produz uma forte reação inflamatória caracterizada pela presença de úlceras, as quais provavelmente estão relacionadas à diarreia. O quadro clínico caracteriza-se por diarreia aquosa podendo apresentar muco ou sangue (NATARO; KAPER, 1998).

2.1.6 *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC)

O trato urinário é um dos sítios mais comuns de infecções bacterianas e *E. coli* UPEC é um dos principais agentes relacionados a essas enfermidades, sendo responsável por graves prejuízos à suinocultura relacionados à infertilidade, redução de peso, mortalidade dos leitões e gastos com medicação (BRITO et al., 2004).

As infecções urinárias ocorrem pela penetração e multiplicação da bactéria no trato urinário, sendo que geralmente são ascendentes do trato gastrointestinal (SOBESTIANSKI et al., 1999). As fêmeas suínas são mais suscetíveis a estas infecções devido à proximidade anatômica dos tratos gastrointestinal e urinário, além de problemas de manejo como estresse hídrico e reduzido tamanho das baias (SOBESTIANSKY et al., 1991).

Diversos fatores são relacionados com a ocorrência da enfermidade, especialmente as adesinas, hemolisinas, aerobactinas, fímbrias não hemaglutinantes 987P (F6), fímbrias de hemaglutinação dependente da ausência de manose (HAMS), fímbrias não-dependentes da presença ou ausência de manose (HAMR), cápsula, resistência ao soro e produção do fator citotóxico necrotizante (CNF), necessário para que a bactéria permaneça aderida ao local da infecção, sendo esta adesão mediada por fímbrias (BRITO et al., 2004; GYLES et al., 2004; CHEN et al., 2006).

Os genes *pap e sfa* que codificam para adesinas fimbriais presentes em *E. coli* UPEC são organizados em operons, (YURI et al., 1999; BLANCO et al., 1997). Estes fatores de virulência auxiliam na inibição ou subversão das defesas do hospedeiro, provocando alterações fisiológicas e invasão de tecidos, o que causa uma resposta inflamatória severa (JOHNSON et al., 2001).

Geralmente o curso da infecção é subclínico, porém podem ser observados sinais de apatia, febre, dificuldade de levantar e permanecer em estação, além de alterações físico-químicas na urina e secreção vaginal (STRAW et al., 1999).

2.2 Diagnóstico de infecções causadas por *E. coli*

O diagnóstico de infecções causadas por *E. coli* é realizado pela observação dos sinais clínicos característicos, dados epidemiológicos e exames laboratoriais, sendo estes essenciais

para a caracterização de isolados patogênicos, pois este microrganismo é comensal da urina e fezes de animais saudáveis (BRITO et al., 2004).

O cultivo desta bactéria em laboratório pode ser realizado em meio de cultura sólido, no qual as colônias são observadas após 24 horas de incubação, apresentando aspecto mucóide. Alguns isolados apresentam hemólise em meio de ágar sangue ovino 5%, sendo este um critério utilizado na determinação do potencial patogênico de *E. coli* (BRITO et al., 2004). Entretanto, colônias não hemolíticas também podem apresentar fatores de virulência (SCHIERACK et al., 2006). Em ágar Mac Conkey, caracteriza-se por fermentar a lactose, o que auxilia na diferenciação de outras bactérias de origem entérica.

E. coli é identificada por diferentes características bioquímicas, como ausência da enzima citocromo oxidase, produção de indol, redução de nitratos, fermentação da glicose e outros carboidratos, produção de gás. A maioria dos isolados não produz ácido sulfídrico (H₂S) (QUINN et al., 1994, STROHL et al., 2004). Contudo, a identificação fenotípica deve ser utilizada com prudência, por não apresentar 100% de fidedignidade, pois aproximadamente 10% das cepas são lactose negativa, e 1% das cepas não produzem indol, que se constitui no principal teste para diferenciação de *E. coli* dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* (NATARO; KAPER, 1998). Além disso, está sujeito à subjetividade da leitura e interpretação dos testes.

Na maior parte dos casos, somente o isolamento de *E. coli* a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal pode não ser suficiente para o diagnóstico da enfermidade. A sorotipificação do isolado é também importante para caracterização da espécie. Este agente é classificado sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica; antígenos somáticos (O) para os sorogrupos e antígenos flagelares (H) para os sorotipos. Pode, ainda, expressar antígenos capsulares (K) e fimbriais (F), que são importantes na patogênese (NATARO; KAPER, 1998). A classificação sorológica do microrganismo é, no entanto, limitada, pois somente algumas cepas de *E. coli* possuem anti-soros disponíveis para sorotipificação.

Outros fatores importantes podem ser utilizados para caracterização deste agente, como as exotoxinas produzidas pela bactéria, que atuam diretamente no intestino, além de endotoxinas presentes na parede celular, hemolisinas, sideróforos e adesinas (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). A técnica de PCR tem sido amplamente utilizada para caracterização da patogenicidade de *E. coli* pela detecção dos diferentes fatores de virulência e caracterização dos patotipos (BRITO et al., 1999; BEIER et al., 2005). Esta metodologia apresenta como vantagens a rapidez na obtenção dos resultados, alta

sensibilidade e especificidade. No entanto, é uma técnica que necessita de padronização, sendo muitas vezes considerada onerosa, de acordo com a quantidade de *primers* utilizados, além da necessidade de pessoal treinado para a execução da mesma (QUINN et al., 1994, STROHL et al., 2004).

2.3 Grupos filogenéticos em *Escherichia coli*

Devido a fenômenos evolutivos vários grupos bacterianos têm se separado dentro das espécies de microrganismos. A caracterização destes grupos é muitas vezes prejudicada por limitações nas técnicas comumente empregadas para esta finalidade. Uma estratégia que vem sendo utilizada na identificação da origem evolutiva de *E. coli* extra-intestinais é a análise da distribuição dos marcadores de patogenicidade para classificação dos isolados nos grupos filogenéticos (JOHNSON et al., 2001). As análises filogenéticas têm mostrado que cepas deste agente podem ser classificadas dentro de quatro grupos principais: A, B1, B2 e D. As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados comensais pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT et al., 2000; SABATÉ et al., 2006).

Cepas desses quatro grupos diferem entre si em suas características fenotípicas, incluindo a habilidade na utilização de diferentes açúcares, perfil de resistência aos antimicrobianos e temperatura ideal de crescimento (GORDON, 2004). O tamanho do genoma também varia entre os grupos filogenéticos, sendo que cepas dos grupos A e B1 têm o genoma menor que os grupos B2 e D (BERGTHORSSON; OCHMAN, 1998). Os isolados também diferem de acordo com seus nichos ecológicos e presença de determinados fatores de virulência. Com isso, cepas dos grupos B2 e D não são freqüentemente encontradas em amostras ambientais (WALK et al., 2007). Já isolados de peixes, anfíbios, répteis e as amostras ambientais são geralmente classificadas nos grupos A ou B1 (GORDON; COWLING, 2003).

Análises filogenéticas têm sido freqüentemente realizadas em bactérias, especialmente em *E. coli* isoladas de amostras humanas (JOHNSON et al., 2001; JOHNSON et al., 2002). No entanto, em medicina veterinária esses estudos são mais escassos, voltando-se especialmente para a área de pequenos animais. Trabalho realizado por Johnson et al. (2001), demonstrou que isolados do trato urinário de cães e de amostras de infecções extra-intestinais

de humanos positivos para fatores de virulência foram classificados filogeneticamente nos grupos considerados patogênicos, o que demonstra a utilidade dessa ferramenta para classificação das amostras.

Três candidatos a marcadores de patogenicidade têm sido estudados na classificação filogenética: *chuA*, um gene necessário para o heme transporte em *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) (MILLS; PAYNE, 1995; BONACORSI et al., 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida (BLATTNER et al., 1997) e um fragmento de DNA designado TSPE4.C2 (BONACORSI et al., 2000).

Clermont et al. (2000) desenvolveram uma técnica de PCR triplex para caracterizar os isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos baseando-se na presença ou ausência de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento de DNA anônimo (TSPE4.C2). Entretanto, alguns isolados podem não ser claramente classificados por não pertencerem a um dos quatro grupos filogenéticos principais de *E. coli*. O esquema de classificação está demonstrado na figura 1.

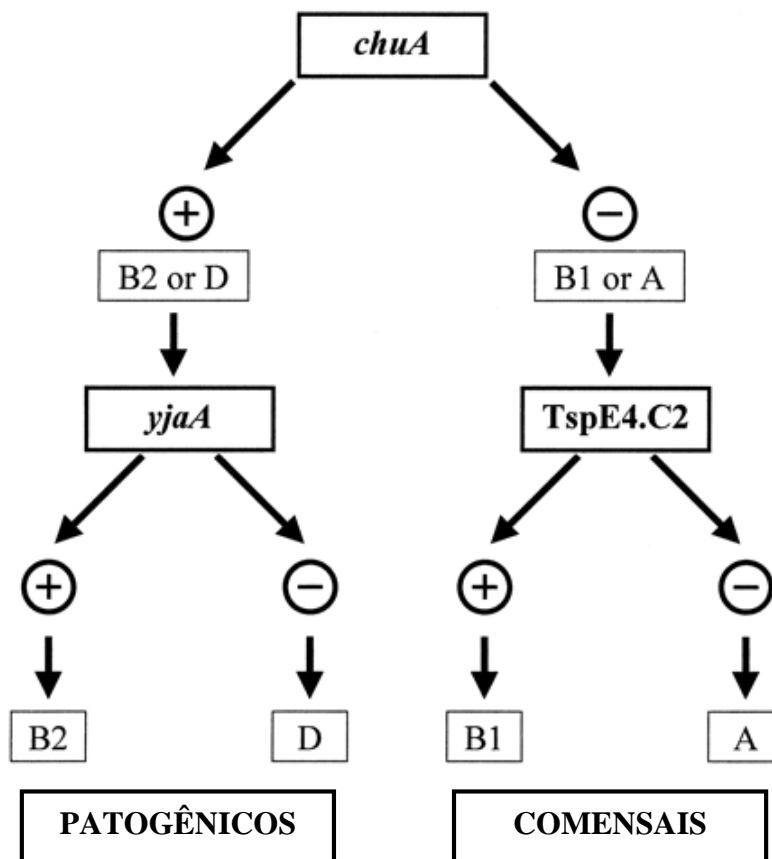


Figura 1. Classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos pela amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA TSPE4. C2.

Fonte: Adaptada de CLERMONT et al., 2000.

O agrupamento filogenético pode também ser realizado com auxílio de enzimas multilocus ou por ribotipagem. Porém, estas técnicas são complexas, laboriosas e necessitam de um banco com diferentes cepas. Com isso, a filogenia por meio de PCR utilizando três *primers* propostos por Clermont et al. (2000) é um método mais rápido e simples para classificação dos isolados de *E. coli*, nos diferentes grupos pela detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2. Esse método é bastante útil na classificação de cepas desconhecidas de *E. coli*, identificando-as como patogênicas ou comensais (GORDON et al., 2008).

Recentemente, um estudo avaliou a distribuição filogenética de amostras de *E. coli* isoladas de aves (CAMPOS et al., 2008). No entanto, poucas são as pesquisas referentes à caracterização molecular e classificação filogenética de amostras provenientes de suínos.

3 CAPÍTULO 1

PHYLOGENETIC AND PATHOTYPE ANALYSIS OF *Escherichia coli* SWINE ISOLATES FROM SOUTHERN BRAZIL

Lilian Kolling, Agueda Castagna de Vargas

Artigo submetido à revista Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

Phylogenetic and Pathotype Analysis of *Escherichia coli* Swine Isolates from Southern Brazil

Abstract

The current study evaluated the presence of different virulence factors in intestinal and extraintestinal *E. coli* swine isolates by a multiplex PCR technique (mPCR) and phylogenetically classified into groups A, B1, B2 and D using the detection of genes *chuA*, *yjaA* and an anonymous DNA fragment designated as TSPE4.C2. A total of 152 *E. coli* isolates from urine, feces, small intestine and tissue (70, 35, 35, and 12 samples, respectively) were analyzed. Seventy seven (51%) isolates tested by mPCR were positive for virulence factors. Phylogenetic characterization placed 21 (14%) samples into group A, 65 (42%) into B1, 19 (13%) into B2 and 47 (31%) into D. Fourteen (20%) urine samples were classified as uropathogenic *E. coli* (UPEC), nine (12.8%) were both UPEC and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and four (5.8%) were ETEC only. The most common phylogenetic classifications were the D (45.8%) and B1 (32.8%) groups. Of the analyzed fecal samples, 25 (71.4%) were classified as ETEC. Phylogenetically, the group of higher incidence was B1, followed by B2, A and D. For the small intestine samples, 20 (57.2%) were classified as ETEC. Phylogenetic analysis found groups B1 and A to be the most common groups in these samples. Six isolated tissue samples (50%) were classified as ETEC, most of them designated as group D by phylogenetic classification. Considering the concordance of the techniques, the phylogenetic analysis could be able to be employed in veterinary laboratories in the *E. coli* isolates screening, including the possibility of vaccine strains selection and epidemiological search. The mPCR method, however, must be used in order to search specific virulence factors.

Key words: Phylogeny, Pathological typification, *E. coli*

Introduction

Escherichia coli are a normal inhabitant of human and animal intestine. Some *E. coli* strains can cause a wide variety of intestinal and extraintestinal diseases, such as diarrhea, urinary tract infections and septicemia²⁶. Disease incidence is associated with many factors, that include the particular animal characteristics, poor nutrition and innapropriated handling¹⁰, and the pathogenicity of the involved strain¹⁷.

E. coli isolates are characterized in different pathotypes according to the presence of specific virulence factors. The main pathotypes in swine diseases are enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), characterized by the presence of the toxins STa, STb and LT and F4, F5, F6, F18 or F41 fimbria; enteropathogenic *E. coli* (EPEC), which contains the *eae* gene; Shiga toxigenic or verotoxigenic *E. coli* (STEC or VETEC), characterized by the presence of factors such as F18a/b fimbria and Stx2 toxin, and finally the uropathogenic *E. coli* (UPEC), which contains at least one of the following genes: *cnf*, *hly*, *bfp*, *eae*, *sfa*, *pap*, *iha* and *usp*^{10, 11, 1}.

The illnesses diagnosis is carried out by phenotypic tests for microorganism identification; however, these tests are limited due to the evaluation subjectivity and to the individual variations of each strain. Serotypification can also be used to classify the species, but no anti-serums are available for serotypes identification. Therefore, the virulence factors genotypification of *E. coli* by PCR has been widely used for characterize the pathotypes^{2, 9, 35}.

Studies have attempted to identify the evolutionary origin of extraintestinal *E. coli* by using pathogenic marker analysis to classify the isolates into different phylogenetic groups¹⁹. Phylogenetic analyses have shown that strains of this agent can be placed into four main groups: A, B1, B2 and D. The virulent strains usually belong to group B2 and, to a lesser extent, to group D. Conversely, the commensal isolates belong to groups A and B1^{13, 32}. Using this classification, three markers were determined in this study using a PCR technique for phylogenetic groups¹³. We evaluated *chuA* presence, a necessary gene for heme transport in enterohemorrhagic *E. coli* (O157:H7)^{8, 23}, *yjaA*, a gene initially identified in the *E. coli* K12 genome and in which the function is still unknown⁷ and an anonymous fragment of DNA designated as TSPE4 C2⁸.

In Brazil, there are a limited number of studies involving the molecular characterization of *E. coli* strains of swine origin^{10, 14, 15} as well as its classification in phylogenetic groups²⁵. The aims of this work were to characterize the isolates of swine *E. coli* using multiplex PCR (mPCR) to fimbria and toxins, to phylogenetically classify these isolates and to evaluate the possible use of the phylogenetic method in veterinary routine diagnosis.

Materials and Methods

A total of 152 isolates of *E. coli* were used in this study: 70 gilt urine samples of animals from farms with reproductive and urinary problems (however the status of each animal was unknown), 35 fecal samples of farms presenting problems of diarrhea in piglets, 35 samples of intestinal content from piglets and 12 tissue samples (six from the liver, three from the lungs, two from the brain and one from the gall bladder) of animals with clinical signs of diarrhea and dehydration. All samples collected in swine breeding farms at the same time and region in Southern Brazil. The samples were previously identified by biochemical tests³¹ and kept lyophilized until bacterial DNA extraction by the thermal extraction method. Isolated colonies on ovine blood agar 5% were diluted in sterile deionized water and boiled for 7 minutes, and then were centrifuged at 13,000 rpm in centrifuge^a for 5 minutes. The DNA was obtained from the supernatant and was used for different PCR methods.

The *E. coli* samples were genotyped using two mPCR to detect fimbria and toxins by amplifying the following gene regions: STa (158 bp), STb (113 bp), LT (272 bp), STx (758 bp), F4 (499 bp), F5 (230 bp), F6 (520 bp), F18 (313 bp), F41 (613 bp), for the intestinal isolated, feces and tissue and *cnf* (543 bp), *hly* (1117 bp), *bfp* (326 bp), *eae* (368 bp), *pap* (328 bp), *iha* (827 bp), *sfa* (410 bp), *cnf* (543 bp) and *usp* (440 bp) for the urinary isolates, as previously described^{5, 6, 9, 14}. The mPCR was carried out with reactions of 25 µl containing 100 ng of DNA, primers (30 pmol of each one)^b, 1X Taq buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂)^c, 200 µM dNTPs^c and 1 U of Taq DNA polymerase^c. Thermocycle^d conditions were: 35 cycles of 45 seconds at 94°C, 1 minute at 55°C, 45 seconds at 72°C and a final extension of 7 minutes at 72°C.

E. coli isolates were classified by phylogenetic PCR previously described¹³. The PCR mix reaction was the same described above. The amplification of genes *chuA* (279 bp) and *yjaA* (211 bp) and TspE4.C2 (152 bp) DNA fragment was obtained with a denaturation step for 5 minutes at 94°C, followed by 30 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C and 30 seconds at 72°C and a final extension of 7 minutes at 72°C.

Aliquots of 10 µl amplification products were submitted to electrophoresis for 45 minutes at 100V in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. DNA fragments were compared with 50 bp DNA ladder^c. Gel was then visualized and photographed under UV light^e. The classification in phylogenetic groups was based on previous descriptions¹³. B2 group includes isolates *chuA*+/*yjaA*+; D group, *chuA*+/*yjaA*-; B1 group, *chuA*-/TSP E4.C2+

and A group, *chuA*-/TSPE4.C2-. Results of the two techniques were evaluated using a chi-square test. P-values < 0.05 were considered significant.

Results

The phylogenetic classification of the urine, small intestine, fecal and tissue isolates compared to the presence or absence of virulence factors by mPCR is described in Table 1. Of the 152 *E. coli* isolates tested by mPCR, 51% (77) were positive for at least one of the virulence factors, while the phylogenetic characterization found 14% (21) isolates in group A, 42% (65) in B1, 13% (19) in B2 and 31% (47) in group D.

Of the 70 urine samples, 61.4% (43/70) were negative for the virulence factors tested by mPCR. The remaining 38.6% (27/70) were positive for one or more virulence factors. Twenty percent (14/70) were classified as UPEC, 12.8% (9/70) as both UPEC and ETEC and 5.8% (4/70) as ETEC (Figure 1A). In the phylogenetic grouping, 55.8% (39/70) were classified into groups B2 and D, which 45.8% (32/70) were classified as group D. The 44.2% (31/70) remaining urine isolates were classified as either group A or B1. Group B1 had the second highest percentage of isolates with 32.8% (23/70). From the 31 samples phylogenetically classified as commensals, 29% (9/31) were found to contain one or more virulence factors using mPCR, while out of the 39 samples considered pathogenic, 53.8% (21/39) did not show any virulence gene ($P < 0.05$).

Of the 35 fecal samples analyzed, 71.4% (25/35) contained one or more virulence factors characteristic of ETEC (Figure 1B). In the phylogenetic analysis, the most abundant group was B1 with 60% (21/35) of the samples, followed by B2 with 17.2% (6/35), group A with 14.2% (5/35) and group D with 8.6% (3/35) of the isolates. Twenty-six (74.2%) of the 35 samples were placed in the groups considered to be commensals, of which 38.4% (10/26) did not show any virulence factor in mPCR. In all of the nine samples considered pathogenic, however, at least one of these factors was present ($P < 0.005$).

Of the 35 samples from the small intestine, 57.2% (20/35) were characterized as ETEC (Figure 1C). In the phylogenetic analysis, 65.6% (23/35) of the isolates were classified in groups A or B1 (14.2% and 51.4%, respectively). A total of 34.4% were placed into groups B2 (6/35) and D (6/35). From the samples classified in pathogenic phylogenetic groups, 66.6% (8/12) were found to be positive for virulence factors by mPCR. These factors, however, were also found in 52.2% (12/23) of the samples that were considered commensals.

None of the fecal or small intestine samples had characteristic factors of EPEC or STEC ($P < 0.05$).

For the 12 tissue isolates, 50% (6/12) were classified as ETEC (Figure 1D). By phylogenetic classification, 50% (6/12) of the samples were placed into group D, followed by groups A and B1, each of which contained 25% (3/12) of samples. Of the six samples considered pathogenic, 83.4% (5/12) contained virulence factors. Of the six samples considered to be commensal, only 16.6% (1/12) was positive for these genes ($P < 0.05$).

Discussion

The phylogenetic classification performed in this work demonstrated that the more representative groups observed among swine *E. coli* isolates were B1 and D, different of finding in previous human studies^{4,30} in which the most prevalent groups from extra-intestinal infections were A and B2. In Brazil, another study showed a higher incidence of group D in avian strains¹¹. Strains of human origin are expected to be in B2 *E. coli* group, associated to high sensitivity to antimicrobial drugs and virulence. Whereas animals strains are more resistant to antibiotics, least virulent and classified in non B2 groups³³. These differences may also be correlated to geographical variations and/or individual characteristics of the hosts³⁸. Besides, these findings can be explained by the insufficiency of studies involving phylogenetic analyses of swine samples, as well as in standard reference strains of natural populations (ECOR collection), which contains only two strains from this species²⁵.

The majority of urine isolates were negative for virulence factors when tested by mPCR. These data are consistent with previous findings¹⁵. Some samples were classified as UPEC, while others were positive for UPEC and ETEC virulence factors. This result is consistent with previous findings that demonstrated the presence of these two pathotypes in swine samples⁹. Urinary strains demonstrating only ETEC factors were also observed in this study. These data reinforce the fact that urinary tract infections in gilts can be ascendant to gastrointestinal tract^{9, 27}. The phylogenetic analysis demonstrated that the urinary samples classified in pathogenic groups were placed primarily into group D, a finding different that others studies witch observed that human pathogenic extraintestinal strains were typically classified in group B2^{4, 18, 29, 30}. According to study³³, animal *E. coli* isolates are classified in non B2 groups. Others have found that atypical strains of EPEC placed into group D were positive for a large number of virulence factors¹ by DNA microarray analysis. A higher number of urine samples were classified in commensals groups, most of them in group B1.

These data are different from previous findings that showed that non-pathogenic strains are typically placed into group A¹³. Previous findings from commensal *E. coli* strains of animals and humans demonstrated diversity in the distribution of the phylogenetic groups of different populations²⁸.

Of the 70 fecal and small intestine samples, the largest percentage was placed into the groups A and B1. Study¹² evaluating clinical and commensal *E. coli* classified the isolates in A and B1 groups. The same result was described for fecal samples³⁰. This can reflect a preference of specific virulence factors coding for plasmids by certain genetic groups³⁶. Using mPCR, we found that none of the fecal or small intestine isolates was classified in EPEC or STEC pathotypes. These results support previous findings of *E. coli* pathological typification isolates in Brazil¹⁴. Others have also found low rates in the incidence of characteristic factors to both of these pathotypes²¹.

Fifty two percent of the commensal isolates presented virulence genes in mPCR. This was also determined in 29% of the urine samples. Clinical and commensal *E. coli* strains have been diverse in their genetic traits. Commensal *E. coli* were several times considerate silent autochthones bacteria, but could harbor virulence genes. In this case, the lack of the correct gene association may be related to no disease development. The presence of virulence genes is not equivalent to its expression. Genes that get turned to facilitate infections are dependent of environment and immunologic conditions¹².

Studies suggesting that *E. coli* isolates may have a multi-ancestral origin, one from pathogenic lineage and another from non-pathogenic lineage that possibly evolved by the horizontal acquisition of virulent genes³⁴. In poultry, the association of plasmidial genes in virulent isolates suggests that APEC is well equipped for a pathogenic life style. In contrast, commensal isolates were opportunistic pathogens that take advantage in an immunocompromised host²⁰. Besides according to another study¹², the presence of human *E. coli* virulence genes in porcine *E. coli* should not be considered as a process of active virulence gene transfer. In contrast, both *E. coli* groups may maintain these genes as part of a survival mechanism to increase diversity and their survival capability in the hosts.

The remaining 21 fecal and small intestine samples were placed into pathogenic groups B2 and D. Of the 34.2% (12/35) pathogenic isolates from the small intestine, 33.4% (4/12) were negative for all of the tested virulence genes. However, the absence of these genes does not mean that the samples are not virulent, since the pathogenesis of *E. coli* can be evaluated by some other genes¹⁶, not much studied, that were not tested in the present study. The combination of virulence genes cannot fully define each pathotype, but may contribute to

typify syndrome disease¹². Under different selection pressures clones that possess nonvirulent virulence genes could be eliminated and replaced with less frequent ones. These changes may be associated with the use of *E. coli* in immunization programs of sows to produce protective antibodies in the colostrums^{12, 37}.

Fifty percent of the tissue samples analyzed here were placed into group D and the remainder were equally distributed into groups A and B1. In the other hand, according to previous work, strains from groups B1 and D presented high virulence for laboratorial animals³⁰, suggesting the incidence of these groups in these clinical samples.

The direct search of virulent determinants by mPCR is essential to the correct evaluation of *E. coli* pathogenesis. This search is limited, however, because only the main known factors are investigated, which most likely does not reflect reality³⁰. Our results diverged from studies using human strains^{30, 32}, but confirms study^{12, 33} about swine and others animal species *E. coli* isolates. In our study isolates containing virulence factors were primarily grouped into the phylogenetic D (urine strains) and B1 (feces and intestinal strains) groups, what could be the standard for pig samples. In Brazil, avian strains were also classified primarily in group D¹¹. The same was described by another study²⁰ that report the classification of pathogenic and commensal avian *E. coli* isolates in groups A, B1 and D. This way, results of the research employing PCR phylogenetic typification based on chromosomal genes, may be not correlated with pathogenesis detection of virulence genes carried in plasmids²⁰. The literature^{22, 24} shows that no absolute definition of virulence in *E. coli* is possible considering differences in species pathogenesis the phylogenetic technique can be used for grouping swine pathogenic isolates while no essential virulence genes would be determined. Considering the concordance of the techniques, the phylogenetic analysis could be able to be employed in veterinary laboratories in the *E. coli* isolates screening, including the possibility of vaccine strains selection and epidemiological search. The mPCR method, however, must be used in order to search specific virulence factors.

Sources and manufacturers

- a. Micro Centrifugette 4214 ALC
- b. Invitrogen, Brazil
- c. Ludwig Biotecnologia Ltda, Porto Alegre, RS, Brazil.
- d. Thermocycle PTC-100TM, MJ Research, INC.
- e. L-PIX ST. Loccus Biotecnologia, Brazil.

References

1. Afset JE, Anderssen E, Bruant G, et al.: 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 L. J Clin Microbiol 46:2280-2290.
2. Beier RC, Bischoff KM, Ziprin RL, et al.: 2005, Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. Bulletin of Environment Contamination Toxicology 75:835-844.
3. Bertschinger HU, Fairbrother JM: *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. Diseases of swine, 5th ed., pp. 431-468. Iowa State University Press, Ames, IA.
4. Bingen E, Picard B, Brahimi N, et al.: 1998, Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. J Infect Dis 177:642-650.
5. Blanco JE, Blanco M, Blanco J, et al.: 1996, O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J Clin Microbiol 34:3101-3107.
6. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, et al.: 1997, Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. Res Microbiol 148: 745-755.
7. Blattner FR, Plunkett GI, Bloch CA, et al.: 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277:1453-1461.
8. Bonacorsi SPP, Clermont O, Tinsley C, et al.: 2000, Identification of regions of the *Escherichiacoli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. Infect Immun 68:2096-2101.
9. Brito BG, Leite DS, Linhares RE, Vidotto MC: 1999, Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. Vet Microbiol 65:123-132.
10. Brito BG, Guimarães B, Vidotto MC et al.: 2004, Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* - UPEC strains for pigs. Ciência Rural 34: 645-652.
11. Campos TA, Lago JC, Nakazato G, et al.: 2008, Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). Pesq Vet Bras 28:533-540.
12. Chapman TA, Wu XY, Barchia I, et al.: 2006, Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. Appl Environ Microbiol 72: 4782-4795.
13. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen, E: 2000, Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. Appl Environ Microbiol 66:4555- 4558.

14. Costa MM, Silva MS, Spricigo DA, et al.: 2006, Epidemiology, molecular characterization and resistance to antimicrobials of *Escherichia coli* isolated from South-Brazilian pig herds. *Pesq Vet Bras* 26:5-8. e.g., Abstract in English.
15. Costa MM, Drescher G, Maboni, F, et al.: 2008, Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. *Braz J Microbiol* 39:1-6.
16. Geyid A, Fletcher J, Gashe BA, Ljungh A: 1996, Invasion of tissue culture cells by diarrheagenic strains of *Escherichia coli* which lack the enteroinvasive *inv* gene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 14:15- 24.
17. Gyles CL, Fairbrother JM: 2004, *Escherichia coli*. In: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Gyles CL, et al, p.193-214. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
18. Gouillet P, Picard B: 1986, Highly pathogenic strains of *Escherichia coli* revealed by the electrophoretic patterns of carboxylesterase B. *J Gen Microbiol* 132:1853–8.
19. Johnson JR, Delavar IP, Kuskowski M, Stell AL: 2001, Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 183:78-88.
20. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, et al.: 2008, Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol* 46: 3987-3996.
21. Macêdo NR, Menezes CPL, Lage AP, et al.: 2007, Detection of pathogenic strains by multiplex PCR and antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* isolated from piglets. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59:5. e.g., Abstract in English
22. Maynard C, Bekal S, Sanschagrín F, et al.: 2004, Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* 42: 5444-5452.
23. Mills M, Payne S: 1995, Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 177:3004–3009.
24. Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, et al.: 2007, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45: 3366-3376.
25. Ochman H, Selander RK: 1984, Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 157:690-693.
26. Orskov F, Orskov I: 1992, *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 38:699–704.
27. Paramo E, Clermont O, Blanc-Potard AB, et al.: 2004, A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21:1085–1094.

28. Picard B, Goulet P, Sammartino AE, Chaventre A: 1990, Electrophoretic polymorphism of esterases in strains of *Escherichia coli* isolated from different host populations. In *Pluridisciplinary Approach to Human Isolates*, pp. 233-242. The Institut National d'Etudes Demographiques (INED), Paris.
29. Picard B, Picard-Pasquier N, Krishnamoorthy R, Goulet P: 1991, Characterization of highly virulent *Escherichia coli* strains by ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism. *FEMS Microbiol Lett* 82:183–8.
30. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, et al.: 1999, The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67:546–553.
31. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR: 1994, *Clinical Veterinary Microbiology*. WOLFE, 1994, 648p.
32. Sabaté M, Moreno E, Pérez T, Andreu A, Prats G: 2006, Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 12:880–886.
33. Sabaté M, Prats G, Moreno E, et al.: 2008, Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res Microbiol* 159: 288-293
34. Silveira WDS, Ferreira A, Brocchi M, et al.: 2002, Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol* 85:47-53.
35. Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, et al.: 2004, Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J Microbiol Immunol Infect* 37:327-334.
36. Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, et al.: 2006, Phylogenetic Comparisons Reveal Multiple Acquisitions of the ToxinGenes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Different Evolutionary Lineages. *J Clin Microbiol* 44:4528-4536.
37. Woodward JM, Connaughton ID, Fahy VA, et al.: 1993, Clonal analysis of *Escherichia coli* of serogroups O9, O20, and O101 isolated from Australian pigs with neonatal diarrhea. *J Clin Microbiol* 31: 1185-1188.
38. Zhang L, Foxman B, Marrs C: 2002, Both Urinary and Rectal *Escherichia coli* Isolates Are Dominated by Strains of Phylogenetic Group B2. *J Clin Microbiol* 40:3951-3955.

TABLE 1 – Phylogenetic classification of urine, feces, small intestine and tissue *E.coli* isolates from swine in comparison with the presence or absence of virulence factors by Multiplex PCR.

Phylogenetic Group	URINE N=70		FECES N=35		SMALL INTESTINE N=35		TISSUE N=12		Percentage of agreement
	+ ^a	- ^b	+	-	+	-	+	-	
A*	0	8	3	2	2	3	0	3	76%
B1*	9	14	13	8	10	8	1	2	49.23%
B2**	5	2	6	0	5	1	0	0	84.2%
D**	12	20	3	0	3	3	5	1	48.93
TOTAL	26	44	25	10	20	15	6	6	

a: presence of virulence factors; b: absence of virulence factors; * Commensals groups; ** Pathogenic groups.

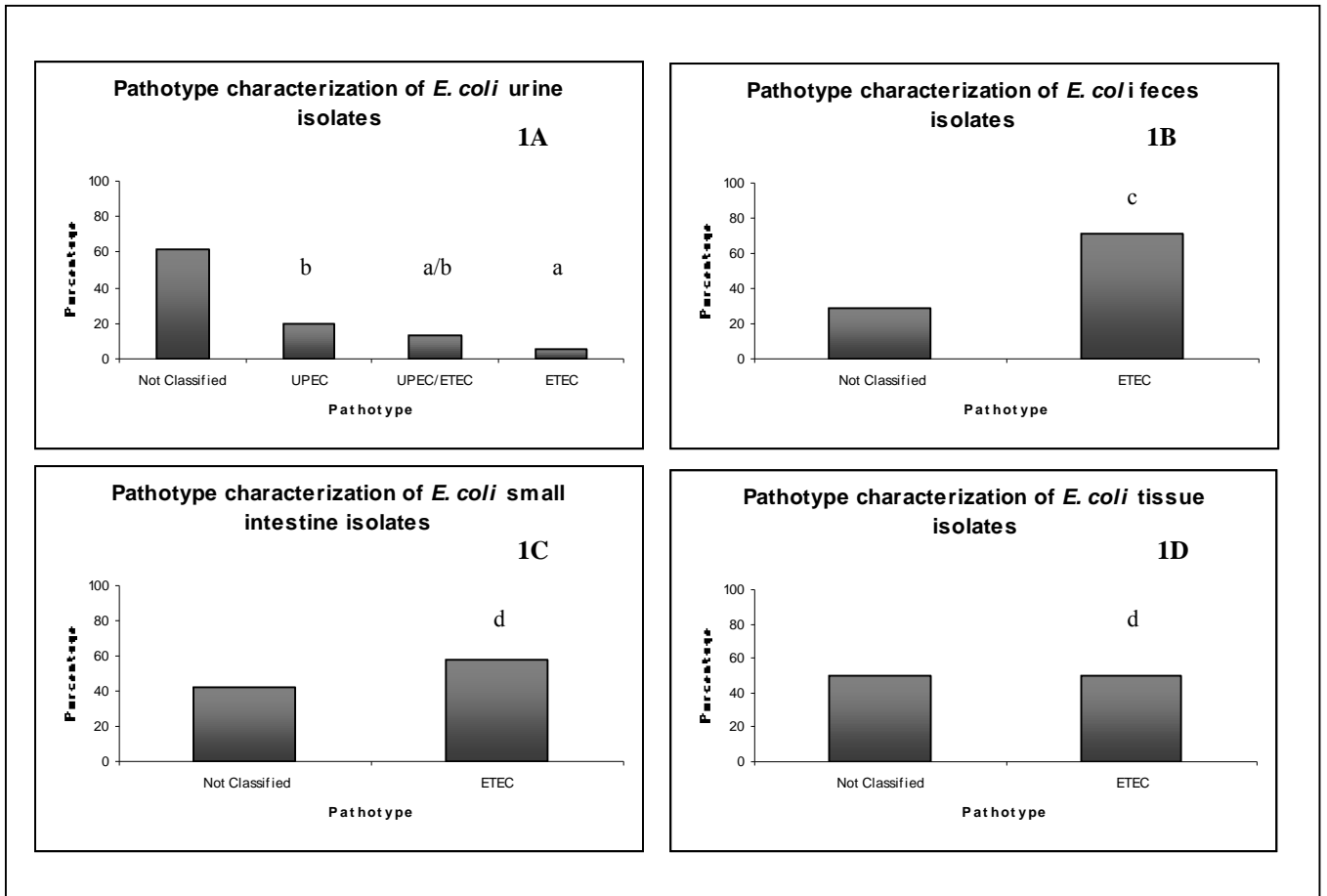


Figure 2. Pathotype characterization and virulence factors of urine (2A), feces (2B), small intestine (2C) and tissues (2D) of *E. coli* isolates from swine. a: presence of at least one virulence factors (Sta, Stb, Stx, Lt); b: presence of at least one virulence factors (Iha, Pap, Hly, Sfa, Usp); a/b: presence of at least one of both virulence factors characteristic of ETEC and UPEC pathotypes. c: presence of at least one virulence factors (F4, F5, F6, F41, Sta, Stb, Stx, Lt); d: presence of at least one virulence factors (F4, F5, F6, Sta, Stb, Lt); Not Classified: negative for virulence factors tested by multiplex PCR.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

A técnica de PCR multiplex descrita tem potencial para ser utilizada na identificação de genes associados à virulência em amostras de *E. coli*.

A técnica de filogenia pode ser utilizada em laboratórios veterinários para avaliar a presença de isolados virulentos de amostras de suínos, inclusive para seleção de cepas vacinais.

Os grupos de maior ocorrência neste estudo foram B1 para os considerados comensais e D para os patogênicos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS 2008: Estatísticas. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 12 de julho de 2008.

AN, H. et al. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, n. 5, p. 291-300, may., 2000.

ARRIAGA, Y. L.; HARVILLE, B. A.; DREYFUS, L. A. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 63, p. 4715-4720, dec., 1995.

BAUR, B. et al. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 62, n. 10, p. 3673-3678, oct., 1996.

BEAUDRY, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 34, n. 1, p. 144-148, jan., 1996.

BEIER, R. C. et al. Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. **Bulletin of Environment Contamination Toxicology**, v. 75, n. 5, p. 835-844, nov., 2005.

BERGTHORSSON, U.; OCHMAN, H. Distribution of Chromosome length variation in natural isolates of *Escherichiacoli*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, Il., v. 15, n. 1, p. 6-16, 1998.

BERTSCHINGER, H. U.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. **Diseases of swine**. Iowa: Iowa State University Press, 1999. Cap. 32, p. 431-468.

BINGEN, E; DENAMUR, E.; ELION, J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clinical microbiology reviews**, Washington, USA, v. 7, n. 3, p. 311-317, jul., 1994.

BLANCO, M. et al. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Research in Microbiology**, France, v. 148, n. 9, p. 745-755, dec., 1997.

BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, New York, USA, v. 277, n. 5331, p.1453-1461, sept., 1997.

BONACORSI, S. P. P. et al. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 68, n. 4, p. 2096-2101, april, 2000.

BRITO, B. G. et al. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 65, n. 2, p. 123-132, marc., 1999.

BRITO, B. G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar./abr., 2004.

BRENNER, D. J. et al. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, England, v. 23, p. 1-7, jan., 1973.

BURROWS, N. R.; RANKIN, J. D. A further examination of the survival of pathogenic bacteria in cattle slurry. **The British Veterinary Journal**, England, v. 116, n. 8, aug., 1970.

CAMPOS, T. A. et al. Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro – RJ, v. 28, n. 10, p. 533-540, oct., 2008.

CARVALHO, V. M. et al. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (SPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 41, n. 3, p. 1225-1234, 2003.

CHAO, K. L.; DREYFUS L. A. Interaction of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 65, p. 3209–3217, aug., 1997.

CHEN, S. L. et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA**, United States, v. 103, n. 103, p. 5977-5982, 2006.

CHOI, C. et al. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. **The Journal of veterinary medical science**, Japan, v. 64, n. 1, p. 71-73, 2002.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, United States, v. 150, n. 3, p. 527-538, 2004.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 66, n. 10, p. 4555- 4558, oct., 2000.

COSTA, M. M. et al. Epidemiology, molecular characterization and resistance to antimicrobials of *Escherichia coli* isolated from South-Brazilian pig herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro – RJ, Brazil, v. 26, n. 1, p. 5-8, jan./mar., 2006.

COSTA, M. M. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 39, p. 1-6, 2008.

CRANE, J. K. et al. Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*(STa) and protein kinase C. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 60, n. 12, p. 5004–5012, 1992.

CRAVIOTO, A. et al. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**, England, v. 337, p. 262-264, 1991.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. London: Academic Press, Ltd, 1974. p. 36–43.

DOUGAN, G. et al. The *Escherichia coli* gene pool. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 4, n. 1, p. 90-94, 2001.

DREYFUS, L. A. et al. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 90, n. 8, p. 3202-3206, apr., 1993.

GARG, A. X. et al. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, USA, v. 290, p. 1360-1370, 2003.

GARTNER, J. F.; SCHMIDT, M. A. Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 72, n. 11, p. 6722-6728, 2004.

GERBER, A. et al. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic–uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 186, p. 493-500, aug., 2002.

GIRÃO, D. M. et al. Characterization of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains of the classical O55 serogroup by RAPD analysis. **Revista de Microbiologia**, São Paulo – SP, Brazil, v. 30, n. 4, p. 1-6, oct./dec., 1999.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, USA, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

GORDON, D. M. The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT, F. et al. (eds). Washington, DC, USA: American Society for Microbiology. [Online] [http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp\(2004\)](http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp(2004)).

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, England, v. 10, n. 10, p. 2484 – 2496, jun., 2008.

GRIFFITHS, A. J. F. Natural Plasmids of Filamentous Fungi. **Microbiological Reviews**, USA, v. 59, p. 673-685, 1995.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. In: GYLES, C. L. et al. *Escherichia coli* In: **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, 3 ed. Ames, Iowa : Iowa State University Press, 2004. p.193-214.

HENTON, M. M.; HUNTER, P. *E. coli* infections. In: COETZER, J. A. W. et al. **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press, 1994. p.1085-1099.

HERZER, P. J. et al. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, jan., 2001.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 185, p. 774-784, marc., 2002.

KAPER, J. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, England, v. 295, n. 6-7, p. 123-140, oct., 2004.

KARMALI, M. et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **The Journal of infectious diseases**, USA, v. 151, p. 775-782, may, 1985.

LECOINTRE, G. et al. *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

MILLS, M.; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 177, n. 11, p. 3004-3009, jun., 1995.

MOXLEY, R. A. Edema disease. **Veterinary Clinicals North America: Food Animal Practice**, USA, v.16, n. 1, p. 175-185, 2000.

NAKAZATO, G. et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 101, n. 4, p. 269-277, aug., 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. Patterns adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, USA, v. 6, n. 9, p. 829-831, sept., 1987.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 60, p. 2297-2304, jun., 1992.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 61, n. 3, p. 1126-1131, mar., 1993.

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

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiological Reviews**, USA, v. 51, p. 206-220, jun., 1987.

PERNA, N.T. et al. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 66, n. 8, p. 3810-3817, 1998.

PITOUT, J. D. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum b-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, USA, v. 49, p. 4667-70, 2005.

PORK WORLD 2008: Sanidade. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br>>. Acesso em: 12 de julho de 2008.

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. WOLFE, 1994. 648p.

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

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, France, v. 12, n. 9, p.880-886, may, 2006.

SARIDAKIS, H. O. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 54, n. 2, p. 145-153, feb., 1997.

SCHIERACK, P.; STEINRUCK, H.; KLETA, S. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 72, n. 10, p. 6680-6686, oct., 2006.

SCHMIDT, H. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. **Medical Microbiology and Immunology**, Germany, v. 183, n. 1, p. 23-31, feb., 1994.

SELANDER, R. K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 51, n. 5, p. 873-884, may, 1986.

SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P. J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, USA, v. 150, n. 5, p. 1539-1546, 2004.

SIXMA, T. K. et al. Refined structure of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **Journal of Molecular Biology**, England, v. 230, n. 3, p. 890-918, apr., 1993.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Infecções urinárias na fêmea suína**. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPISA, 1991. 49p. (Circular Técnica 11).

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**, 2 ed. Goiânia: J. Sobestiansky, 1999. 464 p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**, 1 ed., Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. 770 p.

StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7.

STRAW, B. E. et al. **Disease of swine**, 8 ed.. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. 1209 p.

STROHL, W. A.; ROSE, H. & FISHER, B. D. Bacilos Entéricos Gram-Negativos in: **Microbiologia Ilustrada**. 1 ed. Porto Alegre: Art Méd, 2004, p. 189-204.

SUMMERS, D. K. **The biology of plasmids**. Cambridge : Blackwell Science, 1996. p.157.

TENG, L. J. et al. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, China, v. 37, n. 6, p. 327-334, jun., 2004.

TOTH, I. et al. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, n. 12, p. 7242-7247, dec., 2003.

VILLASECA, J. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, v. 47, n. 3-4, p. 140-159, 2005.

WALK, S. T. et al. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environmental Microbiology**, England, v. 9, n. 9, p. 2274-2288, sept., 2007.

WANKE C. A. et al. Successful treatment of diarrhea associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus. **The Journal of infectious diseases**, USA, v. 178, p. 1369-1372, nov., 1998.

YURI, K. et al. Serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Japan, v. 61, n. 1, p. 37-40, jan., 1999.

6 APÊNDICE

APÊNDICE A – Isolados de *Escherichia coli* oriundos de urina, fezes, intestino delgado e tecidos utilizados na caracterização patotípica e classificação filogenética.

SB	Material	Fatores de virulência	Grupo Filogenético	Patotipos
95/05 cis 02	Urina	Neg	A	N/C*
102/05 - 148	Urina	F4, lha	B1	UPEC/ETEC
137/05 - 49	Urina	neg	A	N/C
140/05 - 246	Urina	neg	B2	N/C
142/05 - 01	Urina	neg	D	N/C
142/05 - 09	Urina	Pap, Hly, lha	B2	UPEC
201/05	Urina	neg	B1	N/C
214/05 - 424	Urina	Sfa	D	UPEC
227/05 - 1123	Urina	Sta, Pap, Hly	D	UPEC
264/05 xax - 4	Urina	neg	B2	N/C
69/06 - 7	Urina	Lt, Sfa	D	UPEC/ETEC
74/06 - 194-4	Urina	neg	B1	N/C
74/06 - 499	Urina	lha	D	UPEC
77/06 - 500	Urina	neg	B1	N/C
77/06 - 880	Urina	neg	D	N/C
150/06 - 179	Urina	neg	D	N/C
150/06 - 84439	Urina	neg	D	N/C
150/06 - 85952	Urina	neg	D	N/C
150/06 - 88112	Urina	neg	B1	N/C
150/06 - 93050	Urina	Stb	B1	ETEC
150/06 - 93065	Urina	neg	A	N/C
150/06 - 95952	Urina	neg	D	N/C
177/06 - 5	Urina	Lt, Pap	B1	UPEC/ETEC
177/06 - 125	Urina	Pap, Hly, Stb	B1	UPEC/ETEC
177/06 - 210	Urina	Hly	D	UPEC
177/06 - 1005	Urina	F4, Sfa, lha	D	UPEC/ETEC
177/06 - 1716	Urina	F4, Pap	B2	UPEC/ETEC
177/06 - 3880	Urina	neg	A	N/C
177/06 - 50079	Urina	neg	D	N/C
177/06 - 60245	Urina	neg	D	N/C
177/06 - 60312	Urina	Lt, Pap, Hly	B1	UPEC/ETEC
177/06 - 72448	Urina	neg	B1	N/C
180/06 - 1566	Urina	Pap	D	UPEC
180/06 - c7541	Urina	Hly, Pap, Sfa	B1	UPEC
189/06 - A.158	Urina	neg	D	N/C
189/06 - 1593	Urina	Hly, lha	B1	UPEC
189/06 - c 8914	Urina	Sta, lha	B1	UPEC/ETEC
189/06 - AF 494	Urina	neg	B1	N/C
191/06 - S/N	Urina	neg	A	N/C
191/06 - 27	Urina	neg	A	N/C
191/06 - 162	Urina	Pap	D	UPEC
191/06 - 199-5 01	Urina	neg	A	N/C
191/06 - 264/05	Urina	neg	B1	N/C
191/06 - 264/06-17	Urina	neg	B1	N/C

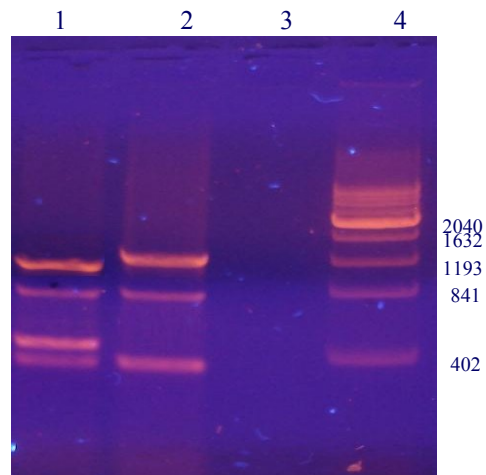
191/06 - 302	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 424	Urina	Sfa	D	UPEC
191/06 - 574	Urina	neg	B1	N/C
191/06 - 589	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 770	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 819	Urina	neg	B1	N/C
191/06 - 837	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 915	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 952	Urina	neg	B1	N/C
191/06 - 1400	Urina	neg	B1	N/C
191/06 - 1014	Urina	neg	A	N/C
191/06 - 1057	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 1229	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 1363	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 1365	Urina	neg	D	N/C
191/06 - 1472	Urina	Stx	B2	ETEC
191/06 - 1521	Urina	Pap, Stx	D	UPEC/ETEC
191/06 - 4441	Urina	neg	B1	N/C
199/06 - 704	Urina	Hly, Iha, Usp	D	UPEC
199/06 - 834	Urina	Pap	B2	UPEC
313/06	Urina	Pap	B1	UPEC
372/06	Urina	Lt	D	ETEC
373/06	Urina	Lt	B2	ETEC
380/06	Urina	neg	B1	N/C
381/06	Urina	F5, Sta	D	ETEC
382/06	Urina	neg	D	N/C
254/92	Int. Delg.	Stb, LT	B1	ETEC
267/92	Int. Delg.	F5	B1	ETEC
269/93	Fezes	Sta, Stb, F107, F4	B1	ETEC
313/93	Fezes	Stb, LT	B2	ETEC
66/94	Fezes	Sta, Stb, F107, F41, Stx	D	ETEC
175/94	Fezes	Stb, Lt, F4	B1	ETEC
176/94	Fezes	Stb, Lt, F4, Stx	B2	ETEC
210/94	Fezes	Sta, Stb, Lt, F107, F4	A	ETEC
225/95	Fezes	Sta, Stb, F107, F41	B1	ETEC
274/95	Fezes	neg	B1	N/C
400/95	Fezes	Stb, F41	B1	ETEC
88/96	Fezes	F5	B2	ETEC
193/96	Fezes	Sta, Stb, Lt, F107, F4, F41	D	ETEC
278/96	Fezes	Stb, F41	B1	ETEC
545/96	Fezes	Sta, Stb, F107	D	ETEC
411/98	Fezes	neg	B1	N/C
439/98	Fezes	neg	B1	N/C
006/00	Fezes	neg	B1	N/C
189/00 - 231	Fezes	F6, F41, LT	B1	ETEC
53/01	Fezes	F5	B1	ETEC
447/01	Fezes	Sta, F107	B1	ETEC
025/02	Fezes	Lt, F5	B1	ETEC
47/02	Fezes	Sta, Stb, F107, F4	B1	ETEC
265/02	Fezes	Stb, Lt, F107	A	ETEC
153/03	Fezes	Lt	B1	ETEC
177/03 - 2	Fezes	Stb, Lt	B2	ETEC

177/03 - 3	Fezes	Stb, Lt	B2	ETEC
177/03 - 4	Fezes	F4	B1	ETEC
177/03 - 5	Fezes	Lt	B1	ETEC
254/03 - F1	Fezes	neg	A	N/C
254/03 - F2	Fezes	neg	B1	N/C
254/03 - F3	Fezes	neg	A	N/C
312/03 - 2	Int. Delg.	Sta, F5	B1	ETEC
57/05	Fezes	F4, F6	A	ETEC
180/05 - A5	Int. Delg.	F107, Lt, Stb	B1	ETEC
180/05 - A.6	Int. Delg.	F107, Lt, Stb	B1	ETEC
180/05 - A.8	Int. Delg.	Lt, Stb	B1	ETEC
180/05 - A.9	Int. Delg.	F5, Stb, Sta	D	ETEC
180/05 - A10	Int. Delg.	F4, LT, Stb	B1	ETEC
180/05 - A11	Int. Delg.	Stb	D	ETEC
180/05 - A31	Int. Delg.	F4, F6, LT	B2	ETEC
247/05 - A.12	Int. Delg.	neg	B2	N/C
247/05 - A.15	Fezes	neg	B1	N/C
247/05 - A.17	Int. Delg.	neg	B1	N/C
272/05 - A.18	Fezes	neg	B1	N/C
272/05 - A23	Int. Delg.	neg	B1	N/C
385/05 - A.28	Fezes	neg	B1	N/C
385/05 - A.29	Int. Delg.	Sta, Stx	B1	ETEC
385/05 - A.31	Int. Delg.	Lt	B2	ETEC
385/05 - A.32	Int. Delg.	neg	B1	N/C
385/05 - A.34	Fezes	Stb	B2	ETEC
385/05 - A.35	Int. Delg.	Stb	B1	ETEC
190/06 - 99	Int. Delg.	F4, F6, F18, F41, LT	D	ETEC
190/06 - 574-1	Int. Delg.	F6, F18, F41, STA, STB	B2	ETEC
190/06 - 831	Int. Delg.	F4, F18,	B2	ETEC
190/06 - 1259	Int. Delg.	F6, F41, STA	B2	ETEC
57/08	Int. Delg.	neg	A	N/C
64/08 Mc 1	Int. Delg.	neg	B1	N/C
64/08 int 2	Int. Delg.	neg	A	N/C
111/08 - 5	Int. Delg.	neg	B1	N/C
116/08 - 3	Int. Delg.	F4	B1	ETEC
116/08 - 4	Int. Delg.	neg	B1	N/C
116/08 - 5	Int. Delg.	neg	B1	N/C
116/08 - 9	Int. Delg.	neg	D	N/C
146/08	Int. Delg.	neg	D	N/C
150/08 - 3	Int. Delg.	Stb	A	ETEC
155/08 - 2	Int. Delg.	F4, Stb	A	ETEC
155/08 - 3	Int. Delg.	neg	B1	N/C
155/08 - 4	Int. Delg.	neg	A	N/C
155/08 - 5	Int. Delg.	neg	D	N/C
312/03	Fígado	Sta, F5	D	ETEC
180/05 - A1	cérebro	F4, F107, LT	D	ETEC
180/05 - A2	Pulmão	F4, F107, Lt	D	ETEC
180/05 - A3	Fígado	F4, F107, Lt	D	ETEC
180/05 - A4	Fígado	F4, F107	D	ETEC
180/05 - A.7	cérebro	F107, Lt, Stb	B1	ETEC
247/05 - A.16	Pulmão	neg	A	N/C
272/05 - A22	Fígado	neg	B1	N/C

272/05 - A24	Fígado	Neg	A	N/C
272/05 - A26	Pulmão	Neg	D	N/C
385/05 - A.30	Fígado	Neg	B1	N/C
146/08	Ves. biliar	Neg	A	N/C

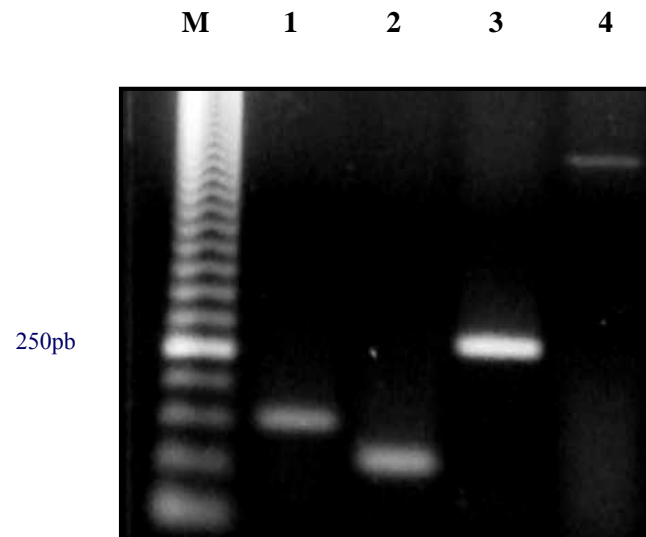
*N/C: Não classificado. Negativo para os genes de virulência testados.

APÊNDICE B – Foto de gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, demonstrando fatores de virulência de isolados de *E. coli* oriundos de urina pela PCR Multiplex.

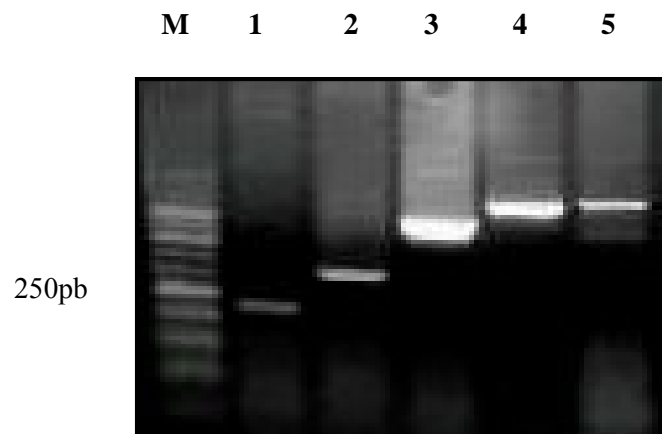


1- Usp (1000 pb), Iha (827 pb), Sfa (410 pb), Pap (328 pb); 2- Hly (1117 pb), Iha (827 pb), Pap (328 pb); 3- Controle negativo; 4- Ladder 400 Pb- Ludwig Biotecnologia Ltda.

APÊNDICE C – Fotos de géis de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, demonstrando fatores de virulência de isolados de *E. coli* oriundos de fezes, intestino delgado e tecidos pela PCR Multiplex para toxinas e fímbrias.

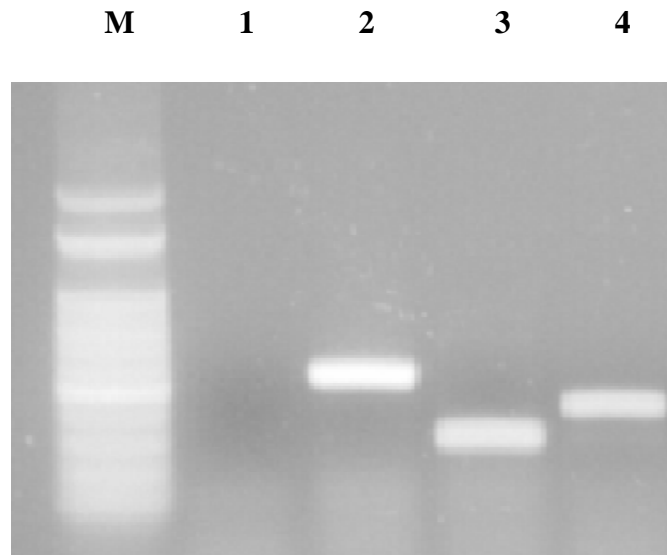


Toxinas: Marcador de massa molecular, ladder 50pb; linha 1: Sta, 158 pb; linha 2: Stb, 113 pb; linha 3: LT, 272 pb; linha 4: Stx, 758 pb.



Fímbrias: Marcador de massa molecular, ladder 50pb; linha 1: F5, 230 pb; linha 2: F18, 313 pb; linha 3: F4, 499 pb; linha 4: F6, 520 pb; linha 5: F41, 613 pb.

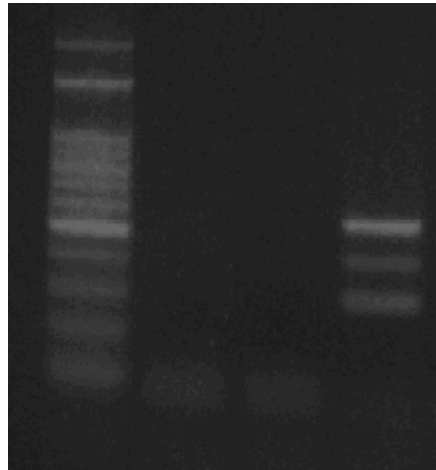
APÊNDICE D - Foto de gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, demonstrando os marcadores de patogenicidade isoladamente, dos isolados de *E. coli* oriundos de urina, fezes, intestino delgado e tecidos pela PCR Filogenia.



M: Ladder 50 Pb- Ludwig Biotecnologia Ltda; 1: Controle Negativo; 2: *ChuA*, 3: *TspE4.C2* e 4: *yjaA*.

APÊNDICE E - Foto de gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, demonstrando os marcadores de patogenicidade dos isolados de *E. coli* oriundos de urina, fezes, intestino delgado e tecidos pela PCR Filogenia triplex.

M 1 2 3



M: Ladder 50 Pb- Ludwig Biotecnologia Ltda; 1: Controle Negativo; 2: Isolado negativo para os genes testados; 3: Isolado apresentando os três genes (*ChuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*).