

MARIO RENE SIBUT MARES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, SUSCETIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS E PERFIL PLASMIDIAL DE
Escherichia coli SHIGA TOXIGÊNICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cyntia M. T. Fadel Picheth

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Giseli Klassen

CURITIBA

2004

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIO RENE SIBUT MARES DE SOUZA

Título: "Caracterização bioquímica, suscetibilidade a antimicrobianos e perfil plasmidial de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica."

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.


Prof.^ª Dra. Cynthia Maria Telles Fadel Picheth
Orientadora


Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka
Pontifícia Universidade Católica do Paraná


Prof.^ª Dra. Roseli Wassem
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de dezembro de 2004

*Dedico este trabalho
à memória de meu
pai.*

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho é possível perceber a construção de um aprendizado. E percebemos que nada teria acontecido se tantas pessoas, direta ou indiretamente, não tivessem colaborado para que isso fosse possível. Assim, quero deixar aqui registrado o meu agradecimento a todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram na realização deste trabalho.

Quero agradecer, em especial a minha orientadora, Dra Cyntia, por ter sido sensível às minhas limitações e dificuldades.

Ao Hormocentro espero retribuir com meu trabalho e dedicação a oportunidade e suporte que me concederam para que eu pudesse realizar o mestrado.

E finalmente agradeço a minha esposa e aos meus filhos que sempre me apoiaram e me deram toda a energia para ir até o final.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO.....	IX
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 ESCHERICHIA COLI SHIGA TOXIGÊNICA.....	4
2.1.1 HISTÓRICO.....	4
2.1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR STEC.....	5
2.1.3 RESERVATÓRIOS E FONTES DE TRANSMISSÃO DE STEC	6
2.1.4 PREVALÊNCIA.....	6
2.1.5 PATOGÊNESE	7
2.1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA	8
2.2 ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO DE STEC	10
2.3 MÉTODOS DE TIPAGEM BACTERIANA.....	12
2.4 PLASMÍDIOS ENCONTRADOS EM STEC.....	14
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 OBJETIVOS GERAIS	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 AMOSTRA.....	17
4.2 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA	17
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	17
4.4 PROVAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS PARA A BIOTIPAGEM	17
4.4.1 ENSAIO DA FENILALANINA DESAMINASE	18
4.4.2 PROVA DE UTILIZAÇÃO DO CITRATO.....	18
4.4.3 TESTE DA UREASE.....	19
4.4.4 PROVA DA ORNITINA E ARGININA DESCARBOXILASES	19
4.4.5 PROVA DE VOGES-PROSKAUER	20
4.4.6 VERMELHO DE METILA (VM)	21
4.4.7 MILI	21
4.4.8 KLIGER IRON AGAR (KIA).....	22

4.4.9	FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES.....	23
4.5	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	23
4.6	TESTE PARA DETECÇÃO DA ENTEROHEMOLISINA	24
4.7	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	25
4.7.1	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL SEGUNDO KADO E LIU.....	26
4.7.2	MINI PREP ALCALINA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). ...	27
4.7.3	ESTIMATIVA DO TAMANHO PLASMIDIAL	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	29
5.2	SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	32
5.3	PRODUÇÃO DE ENTEROHEMOLISINA.....	33
5.4	PERFIL PLASMIDIAL.....	34
6	DISCUSSÃO	41
6.1	MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	41
6.1.1	PERFIL PLASMIDIAL.....	45
7	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO 1.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CDC	- <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
eae	- Gene da intimina
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EHEC	- <i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
EPEC	- <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
hly	- Gene que codifica a enterohemolisina
Kb	- Kilobase
NCCLS	- <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SHU	- Síndrome urêmico-hemolítica
STEC	- <i>Escherichia coli</i> Shiga Toxigênica,
Stx	- Toxina Shiga
stx ₁	- Gene da toxina Shiga 1
stx ₂	- Gene da toxina Shiga 2
Tris	- Tris-hidroximetil aminometano
PTT	- Púrpura trombocitopênica trombótica
UFC	- Unidades formadoras de colônia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FENÓTIPOS ENTEROHEMOLÍTICO E NÃO-ENTEROHEMOLÍTICO DE STEC	33
FIGURA 2. PERFIL PLASMIDIAL DE ESTIRPES DE STEC PERTENCENTES AOS GRUPOS IIA; IIB E IIIB.	35
FIGURA 3. PERFIL PLASMIDIAL DE ESTIRPES DE STEC PERTENCENTES AOS GRUPOS I; IIA; IIC; IID E VA.	36
FIGURA 4. PERFIL PLASMIDIAL DE ESTIRPES DE STEC PERTENCENTES AOS GRUPOS I, IIA, IIIA E IV.	37
FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS PLASMÍDIOS NAS ESTIRPES DE STEC DE ACORDO COM O NUMERO OBSERVADO.....	38
FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PLASMÍDIOS NAS ESTIRPES DE STEC DE ACORDO COM O TAMANHO	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PLASMÍDIOS UTILIZADOS COMO MARCADORES PARA A ESTIMATIVA DO TAMANHO PLASMIDIAL	28
TABELA 2 - PROVAS BIOQUÍMICAS E CÓDIGO NUMÉRICO UTILIZADOS PARA A BIOTIPAGEM	29
TABELA 3 - RESULTADO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS	30
TABELA 4 – RESULTADO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS COMPARADO COM O PERFIL DESCRITO PARA <i>E. coli</i>	31
TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE STEC DE ACORDO COM O BIOTIPO E RESPECTIVA FREQUÊNCIA	32
TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO DAS STEC DE ACORDO COM O PERFIL PLASMIDIAL E VARIAÇÃO NO TAMANHO DOS PLASMÍDIOS	39
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS STEC CONSIDERANDO O PERFIL PLASMIDIAL, BIOTIPOS, E PRODUÇÃO DE ENTEROHEMOLISINA.	40

RESUMO

As *Escherichia coli* Shiga-toxigênica – STEC são patógenos emergentes transmitidos através de água e alimentos contaminados. Os bovinos são o principal reservatório de STEC. Essas bactérias constituem um grupo importante de patógenos entéricos que provocam doenças cujas manifestações variam de diarreia aquosa, colite hemorrágica a complicações graves como a síndrome urêmica-hemolítica. As STEC são caracterizadas pela produção de toxina Shiga, o principal fator de virulência desses microrganismos. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade entre estirpes de STEC isoladas no Paraná. Foram analisadas 42 estirpes das quais 38 foram isoladas de bovinos aparentemente saudáveis de diversas regiões do estado do Paraná, e quatro estirpes isoladas de crianças com doença diarreica. Foram analisados o perfil bioquímico e a suscetibilidade das STEC frente a antimicrobianos; a produção de enterohemolisina, outro fator de virulência dessas bactérias, e o perfil plasmidial desses organismos. As STEC foram classificadas em 17 biotipos com base na variabilidade observada nas provas bioquímicas. A maioria das estirpes mostrou suscetibilidade a todos os antimicrobianos utilizados neste estudo. Onze STEC (26,3%) produziram hemolisina, o que sugere maior virulência dessas estirpes. O perfil plasmidial revelou grande variabilidade entre as estirpes. Quatro STEC não continham plasmídios. As demais foram classificadas em 5 grupos principais contendo 1, 2, 3, 4 ou 6 plasmídios. A maioria das STEC (79%) apresentou: apenas um plasmídio com tamanho superior a 43 kb.

Palavras-chave: STEC, Enterohemolisina, Perfil plasmidial

1 INTRODUÇÃO

Durante a década de 80 a *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) foi reconhecida um organismo patogênico causador de surtos e casos isolados de diarreia, colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica.

As STEC constituem um grupo bioquímica e sorologicamente heterogêneo de *E. coli*, caracterizado pela produção de uma potente toxina, denominada toxina Shiga (PATON; PATON, 1998a). A STEC sorotipo O157:H7 é a mais conhecida, e foi a primeira a ser relacionada com doença enterohemorrágica (RILEY et al., 1983). Entretanto existem outros sorogrupos de STEC geralmente referidos como não-O157, também associados com doença em humanos. A partir do momento em que foram reconhecidas como patogênicas, foram relatados inúmeros casos de infecção provocados por STEC em mais de 30 países nos seis continentes (CDC, 2003). Atualmente as STEC constituem um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (PATON, PATON, 1998b; WHO, 1998).

As STEC são transmitidas aos humanos principalmente através de alimentos contaminados, e em especial os de origem animal. O gado bovino é o principal reservatório das STEC (KARMALI, 1989; GRAY, 1995; WHO 1998).

A toxina Shiga (Stx), principal fator de virulência compartilhado por todas as STEC, é codificada pelos genes *stx*, carregados em bacteriófagos inseridos no cromossomo bacteriano. Além dos genes *stx*, vários outros genes de virulência podem estar presentes nas STEC, como o gene *hlyA*, que codifica uma hemolisina cuja presença tem sido associada com uma maior severidade da doença (KARCH; SCHMIDT; BRUNDER, 1998; NATARO; KAPER, 1998).

No Brasil diversos pesquisadores têm isolado STEC a partir de amostras biológicas de humanos com doença gastrointestinal ou síndrome urêmica-hemolítica, e também a partir de material fecal de bovinos aparentemente saudáveis (CERQUEIRA et al., 1999; CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al., 2002b; MOREIRA et al., 2003; VETTORATO et al., 2003).

No Paraná, os primeiros relatos sobre o isolamento de STEC são recentes. Em estudo envolvendo crianças com diarreia não complicada foi relatada uma frequência de 2% de STEC, similar à descrita no exterior. Nenhuma das estirpes isoladas pertencia ao sorotipo O157 (DE TONI, 2004; DE TONI et al., 2004). Estudos realizados utilizando material fecal de gado bovino aparentemente saudável, e

empregando diferentes metodologias, permitiram o isolamento de STEC em rebanhos de diferentes regiões do estado, com frequência de aproximadamente 40%. Apenas uma estirpe do sorotipo O157:H7 foi isolada, mostrando o predomínio das STEC não-O157 (SILVA, 2002; PIGATTO, 2004).

Considerando os isolados de STEC no Paraná, a partir de amostras clínicas, e a elevada frequência entre o gado bovino, que constitui o principal reservatório, é de interesse epidemiológico o melhor conhecimento desses organismos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é o estudo da diversidade entre estirpes de STEC quanto ao comportamento bioquímico, suscetibilidade a antimicrobianos, produção de hemolisina e perfil plasmidial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A *Escherichia coli* pertence a família Enterobacteriaceae, que é constituída por bacilos gram negativos anaeróbios facultativos, que fermentam a glicose, são citocromo oxidase negativa, reduzem nitratos a nitritos e não formam esporos (FARMER III, 1999).

Descrita em 1885, *E. coli* recebeu diferentes denominações como *Bacterium coli commune* (Escherich, 1885), *Bacillus coli* (Migula, 1895), e *Bacterium coli* (Lehman e Neumann, 1896) até chegar a atual nomenclatura, designada por Castellani e Chalmers em 1919 (HARTL; DYKHUIZEN, 1984; EUZÉBY, 1997).

O habitat natural da *E. coli* é o intestino dos humanos e outros mamíferos, onde é o anaeróbio facultativo mais comum. Embora seja parte da flora normal do intestino, existem estirpes patogênicas de *E. coli* que podem provocar infecções intestinais e extra-intestinais (BOPP et al., 1999; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Poucos microrganismos são tão versáteis como *E. coli*. Embora o genoma de todas as *E. coli* contenha um núcleo comum de genes conservados, existe uma grande variabilidade entre as diferentes estirpes. Existem seqüências de DNA que estão presentes apenas em determinadas estirpes. A versatilidade do genoma de *E. coli* é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas genômicas ou ilhas de patogenicidade de localização cromossomal, que contém sequências que contribuem para a virulência (DONNENBERG; WHITAM, 2001; DOUGAN et al., 2001; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As estirpes patogênicas de *E. coli* se diferenciam das não patogênicas pela expressão de fatores de virulência – moléculas envolvidas no processo de patogênese.

As estirpes patogênicas de *E. coli* estão associadas com diferentes patologias, como diarréia, infecções de trato urinário, sepsis e meningite (NATARO; KAPER, 1998). Apenas entre aquelas que causam diarréia, existem seis categorias descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), e *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC), também denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Essas *E. coli* podem ser diferenciadas com base nas suas características de patogenicidade.

Embora existam entre estes microrganismos, etapas comuns na patogenicidade, ocorre uma notável variação no padrão de comportamento desses patógenos, que pode incluir a produção de enterotoxinas (ETEC, EAEC, STEC), invasão (EIEC) e aderência íntima com sinalização na membrana (EPEC, STEC).

Em todas as seis categorias de *E. coli* citadas já foram descritos genes de virulência codificados em plasmídios. Genes de virulência cromossomais de EPEC e STEC são encontrados agrupados em regiões referidas como ilhas de patogenicidade, que podem representar uma forma pela qual as estirpes patogênicas e não-patogênicas de *E. coli* divergem geneticamente (NATARO, KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.1 *Escherichia coli* Shiga Toxigênica

2.1.1 Histórico

Em 1977 KONOWALCHUK e colaboradores relataram que o filtrado de culturas de algumas estirpes de *E. coli*, isoladas de fezes de crianças com diarreia, continha uma toxina que produzia um efeito citopático irreversível sobre células Vero, sendo a mesma denominada Vero toxina. Foi demonstrado que essa toxina provocava paralisia e morte em camundongos e inibia a síntese de proteínas em células HeLa.

O primeiro relato de infecção causada por *E. coli* enterohemorrágica ocorreu em 1983, durante a investigação de dois surtos de doença gastrointestinal associados com a ingestão de hambúrgueres de uma cadeia de "fast-food" nos EUA. A doença era caracterizada por cólicas abdominais, diarreia aquosa seguida de diarreia hemorrágica, e parte dos acometidos desenvolveu síndrome urêmico-hemolítica. A *E. coli* O157:H7, então raramente encontrada, foi identificada como agente etiológico (RILEY et al., 1983; KARMALI, 1989). No mesmo ano, a *E. coli* O157:H7 foi relacionada com a produção de uma citotoxina detectada nas fezes dos doentes com colite hemorrágica (CH) e síndrome urêmico hemolítica (SHU)

Com a purificação da toxina verificou-se que ela tinha estrutura e atividade biológica similar à toxina Shiga (Stx) de *Shigella dysenteriae* tipo 1, e que o efeito citotóxico podia ser neutralizado por anticorpos anti-Stx. Foi então adotada a

denominação “Shiga-like” toxina (O'BRIEN et al., 1983; O'BRIEN; LAVECK,1983), e posteriormente, toxina Shiga. As estirpes de *E. coli* capazes de produzir tais toxinas foram denominadas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga ou *E. coli* Shiga Toxigênicas.

Durante aquele período apenas a STEC sorotipo O157:H7 havia sido relacionada com doença, mas pouco tempo depois se verificou que mais de 100 sorotipos de *E. coli* são capazes de produzir toxina Shiga e provocar doença em humanos. Essas *E. coli* são geralmente designadas STEC não-O157 (WHO, 1998)..

2.1.2 Manifestações Clínicas das Infecções Causadas por STEC

As STEC podem causar infecções cujo quadro clínico pode variar desde diarreia não complicada, colite hemorrágica a complicações com risco de vida como a SHU e Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT). (PATON, PATON, 1998b; KUNTZ; KUNTZ, 1999; GOLDMAN; BENNETT, 2000).

A colite hemorrágica, presente em até 90% dos casos de infecção causados por STEC, geralmente surge após um quadro de diarreia aquosa acompanhada por cólicas abdominais (PATON; PATON, 1998b).

A SHU é caracterizada por insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (KARMALI et al., 1983). Surge em poucos dias após a ocorrência de diarreia, geralmente hemorrágica (KARMALI, 1989). Alterações neurológicas também podem ocorrer.

Uma série de complicações pode acompanhar a CH e SHU, como colecistite, perfuração do cólon, pancreatite, litíase biliar pós-hemolítica, prolapso retal, apendicite, hepatite, cistite hemorrágica, edema pulmonar, disfunção do miocárdio, (NATARO; KAPER, 1998). A SHU acomete de 2 a 7% dos doentes com colite hemorrágica, e é a complicação mais importante, na qual a taxa de mortalidade varia de 3 a 10%. De 4 a 30% dos afetados podem desenvolver doença renal crônica, cardíaca ou complicações neurológicas (GRAY et al, 1995), incluindo letargia, cefaléia severa, convulsões e encefalopatia (PATON e PATON, 1998b).

A PTT ocorre mais comumente em adultos. Inclui as características da SHU, mas geralmente o dano renal é menos severo e os problemas neurológicos mais

acentuados. Infecções do trato urinário são pouco freqüentes (TARR; NEILL, 1996; WHO, 1998).

Portadores assintomáticos têm sido detectados entre grupos com alto risco de exposição como trabalhadores em fazendas de gado e entre pessoas que mantiveram contato com pacientes com doença causada por STEC (PATON; PATON, 1998b).

2.1.3 Reservatórios e Fontes de Transmissão de STEC

O gado bovino é o principal reservatório de STEC, mas elas também têm sido isoladas de animais como cavalos, cães e ovelhas entre outros (FENG, 1995; KARCH et al., 1999a; VETTORATO et al., 2003).

As STEC são encontradas no intestino de animais sem qualquer tipo de sintomas patológicos (FENG, 1995; ARTHUR et al., 2002), mas algumas estirpes podem estar associadas com diarreia em bezerras (NATARO; KAPER, 1998).

A colonização do trato gastrointestinal de animais por STEC leva à contaminação do ambiente onde eles são mantidos e o contato acidental da carne com o conteúdo intestinal, durante o abate, facilita a transmissão da STEC para os produtos daí derivados (SALYERS; WHITT, 1994; FENG, 1995; ARTHUR et al., 2002).

As principais fontes de contaminação com STEC são alimentos e água, mas também pode ocorrer através de transmissão direta pessoa-pessoa e contato com animais (FENG, 1995; KARCH et al., 1999a). A maioria dos casos de infecção ocorre pela ingestão de produtos que contém carne moída como hambúrgueres mal cozidos, mas já foi documentada a transmissão através de sucos, maionese e vegetais (GRIFFIN; TAUXE, 1991; BERKELMAN, 1997).

A infecção causada por STEC O157:H7, adquirida em laboratório também já foi descrita (BURNENS et al., 1993).

2.1.4 Prevalência

O sorotipo O157:H7 parece ser a STEC mais freqüente nos Estados Unidos com uma prevalência de 73.000 casos/ano, provocando 61 mortes/ano (CDC, 2003).

Nesse país, desde 1993, por recomendação do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), a cultura para *E.coli* O157:H7 é realizada rotineiramente nos laboratórios clínicos (GRAY et al., 1995), o que pode ter levado a uma superestimativa da sua prevalência em relação aos outros sorogrupos de STEC. Entretanto as STEC não-O157 como os sorogrupos O26, O91, O103 e O111 e outros, predominam em outras regiões do mundo. Como a O157:H7 elas também podem ser potencialmente fatais, e têm sido implicadas como causa de surtos nos EUA, Europa e Austrália (PATON et al., 1996; BONNET et al., 1998; PATON; PATON; 1998b; WHO,1998; KARCH et al., 1999a; FEY et al., 2000; PARK; KIM; HIXON; 2002). A incidência de STEC varia entre 1,5 a 4,0% (KEHL, 2002).

No Brasil ainda são poucos os dados disponíveis, mas aparentemente ocorre predomínio das STEC não-O157 (CANTARELLI et al., 2000; IRINO et al., 2002; GUTH et al., 2002b; VAZ, 2004; DE TONI, 2004a, DE TONI, 2004b), e a incidência desses patógenos em pessoas com diarreia varia entre 1 a 2%.

2.1.5 Patogênese

A patogênese é um processo multifatorial e provavelmente a doença é resultante da interação entre os fatores de virulência da bactéria com os fatores de defesa do hospedeiro (SALYERS; WHITT, 1994).

Uma característica importante das STEC é que elas são capazes de provocar infecção mesmo quando presentes em baixo número no inóculo. Estima-se que a ingestão de 1 a 100 células da bactéria é suficiente para causar doença (PATON; PATON, 1998b).

Após a ingestão o patógeno deve sobreviver à acidez do estômago e então competir com os microrganismos que compõem a flora normal para estabelecer a colonização intestinal. As STEC têm a capacidade de resistir a baixo pH, assim podem atravessar o estômago e chegar viáveis ao intestino delgado (GORDEN; SMALL, 1993; DIEZ-GONZALEZ et al., 1998). A habilidade em aderir às células epiteliais do intestino é essencial para a patogênese.

Uma vez no lúmen intestinal inicia-se a produção de toxina Shiga que deve ser absorvida pelo epitélio intestinal, entrar na corrente circulatória e atingir as células alvo. Iniciam-se então, tanto efeitos locais quanto sistêmicos (PATON; PATON, 1998b).

2.1.6 Fatores de Virulência

Entre as principais características relacionadas com a virulência bacteriana estão as habilidades do microrganismo em aderir e colonizar sítios anatômicos do hospedeiro, a produção de toxinas e enzimas ou outras substâncias que causam dano no hospedeiro (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

A capacidade para causar doença varia entre as diversas estirpes de STEC, o que resulta principalmente da distribuição dos genes de virulência entre plasmídios, e bacteriófagos e ilhas de patogenicidade presentes no cromossomo (NATARO; KAPER, 1998).

As toxinas Shiga são o principal fator de virulência das STEC. Estão associadas com o desenvolvimento da colite hemorrágica e SHU. Existem dois tipos principais de Stx, denominados Stx1 e Stx2 que são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente (PATON; PATON, 1998b). Estes genes fazem parte do genoma de bacteriófagos integrados no cromossomo bacteriano. Além de Stx1 e Stx2, foram descritas formas variantes dessas toxinas como *stx_{1c}* (ZHANG et al., 2002), *stx_{2vhb}*, *stx_{2d-ount}*, *stx_{2d-ox3a}* (PIÉRARD et al., 1998), *stx_{2c}*, *stx_{2e}*, *stx_{2ev}* (BASTIAN; CARLE; GRIMONT, 1998), *stx_{2f}* (SCHMIDT et al., 2000), entre outros. As STEC podem conter mais do que um gene *stx* (EKLUND et al., 2001, 2002).

Aparentemente as diversas formas de Stx variam quanto a sua patogênese, uma vez que estirpes de STEC que produzem Stx2 são mais frequentemente associadas com SHU, enquanto que outras como Stx2e têm sido encontradas apenas em casos de diarreia não complicada (BOERLIN, et al., 1999; WERBER et al., 2003).

Uma característica presente em algumas STEC, e compartilhada com EPEC, é a habilidade de induzir lesões do tipo A/E (“Attaching and Effacement”) nos enterócitos. A lesão é causada pela forte adesão da bactéria ao enterócito, seguida da destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura em “pedestal”, composto por proteínas do citoesqueleto densamente agrupadas. Esta característica foi relacionada com a intimina, uma adesina codificada pelo gene *eae* (“*E. coli* attaching and effacement”). Esse gene faz parte de uma ilha de patogenicidade denominada LEE (“Locus of enterocyte effacement”). Essa região do DNA

cromossomal de aproximadamente 42 kb, codifica a intimina além de outros fatores como aqueles necessários para a secreção dessa proteína (MCDANIEL et al., 1995).

Outro fator associado à virulência das STEC é a enterohemolisina codificada pelo gene *hly* localizado em um plasmídeo de 92kb denominado pO157, presente na maioria das STEC O157 e em algumas não-O157 (SCHMIDT; KERNBACH; KARCH, 1996; BURLAND et al., 1998).

Hemolisinas são toxinas protéicas produzidas por muitos patógenos e são capazes de causar lesão celular. Ao contrário de muitas outras toxinas a hemolisina não é internalizada pelas células alvo mas atua como uma citolisina formadora de poro (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995). A enterohemolisina afeta não somente eritrócitos, mas também causa lise em muitas células eucarióticas, contribuindo para a patogenicidade bacteriana. Nos eritrócitos a lesão celular ocorre imediatamente após a exposição à entero-hemolisina, provocando alterações da permeabilidade celular e lesões de superfície que levam a completa destruição da célula (JURGENS; OZEL; TAKAISI-KIKUNI, 2002).

A produção de enterohemolisina pode ser detectada através de cultivo realizado em ágar sangue, preparado com sangue de carneiro lavado. Esta característica tem sido utilizada como mais um marcador para o diagnóstico das STEC (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 1996). Embora cerca de 94% das estirpes do sorogrupo O157 produzam enterohemolisina, existem dados mostrando que essa proteína está presente em apenas 29% das STEC, indicando que a expressão dessa proteína parece estar restrita a alguns grupos desses patógenos (BEUTIN et al., 1989; KHAN et al., 2002).

A enterohemolisina é codificada pelo operon *hlyCABD*, onde juntamente com o gene da hemolisina *hlyA*, estão *hlyC* que responde pela ativação da hemolisina e outros os genes *hlyB* e *hlyD* que representam parte da maquinaria secretora da hemolisina (BURLAND et al., 1998).

Outras características codificadas no pO157 também podem contribuir para a virulência das STEC. Destaca-se o gene *katP* que codifica a catalase-peroxidase, uma enzima bifuncional que protege a bactéria contra o dano oxidativo; uma serina protease extracelular codificada pelo gene *espP*, um sistema de secreção tipo II codificado pelo operon *etp*; além de uma citotoxina que apresenta similaridade com as grandes toxinas de clostrídeos (BURLAND et al., 1998).

A presença simultânea dos genes *eae* e *hly* é predominante entre estirpes O157:H7 e não-O157 isoladas de pacientes com colite hemorrágica e SHU, o que sugere que essa combinação poderia servir como marcador para diferenciar estirpes de STEC mais virulentas (MENG; ZHAO; DOYLE 1998).

Uma outra adesina, cujo gene apresenta localização plasmidial, foi descrita em estirpes de STEC que não apresentam a ilha de patogenicidade LEE. A adesina Saa, (STEC *autoagglutinating adhesin*) foi isolada de estirpes de STEC envolvidas em um surto de SHU (PATON et al, 2001), mas estudo mais recente sugere que não há associação significativa entre estirpes isoladas de pacientes com SHU e *saa* (JENKINS et al, 2003).

2.2 Isolamento e Diagnóstico de STEC

A presença de STEC deveria ser investigada em todos os casos de diarreia, e em especial nos casos de SHU, colite hemorrágica, e pacientes (principalmente crianças) com diarreia aquosa severa que não apresentem evidência de infecção por outro patógeno intestinal. A identificação desse agente é fundamental para que sejam iniciadas as investigações epidemiológicas, busca de novos casos e para que medidas de controle possam ser implementadas para interromper a disseminação da doença (KARCH et al.,1999a). A rapidez no diagnóstico é fundamental, pois o quadro clínico ocasionalmente é confundido com outras condições como inflamação intestinal, apendicite, infecção por *Clostridium difficile* entre outras. Conseqüentemente um diagnóstico rápido pode evitar procedimentos invasivos e a antibioticoterapia, que pode ser contra-indicada para o tratamento das infecções causadas por STEC (PATON; PATON, 1998b).

O diagnóstico microbiológico das infecções causadas por STEC é dificultado principalmente por dois aspectos, o primeiro é a rápida redução do número de patógenos excretados nas fezes poucos dias após o aparecimento dos sintomas gastrointestinais (TARR; NEILL,1995; KARCH et al., 1999a), o que mostra a importância de se analisar as amostras fecais assim que surgirem os sintomas; o segundo é a grande diversidade de sorotipos e comportamentos bioquímicos de STEC; o que inviabiliza o diagnóstico através das técnicas convencionais da microbiologia.

Com exceção do sorotipo O157:H7, que diferentemente da maioria das estirpes de *E. coli*, não fermenta o sorbitol ou o faz lentamente, não existe um método simples para o diagnóstico das STEC não-O157.

Para a STEC O157:H7 o diagnóstico pode ser feito com a cultura em ágar MacConkey-sorbitol. Enquanto as *E. coli* O157 formam colônias incolores, decorrentes da não utilização do sorbitol, aquelas da microbiota intestinal fermentam o sorbitol em menos de 24 horas, formando colônias de coloração avermelhada. Essa característica discriminatória permite isolar as colônias sorbitol negativo e analisá-las frente ao anti-soro anti O157 e também quanto à produção de toxina Shiga para confirmar a presença de STEC (GRAY et al., 1995).

Entretanto, enquanto a O157:H7 pode ser facilmente diferenciada das outras *E. coli* em Agar MacConkey Sorbitol, as outras STEC são praticamente indistinguíveis das *E. coli* que integram a microbiota normal do intestino. A ausência de marcadores fenotípicos nessas estirpes tornou seu isolamento impossível na rotina dos laboratórios clínicos onde métodos específicos não estão disponíveis.

Mesmo o uso do MacConkey Sorbitol apresenta eficácia relativa para o isolamento das STEC O157, uma vez que já foram descritas estirpes sorbitol positivo, envolvidas em formas graves da doença. Outro fator relevante é que estirpes de STEC O157:H7 isoladas de alimentos que contêm sorbitol, podem mudar seu padrão de expressão, passando de sorbitol negativo para sorbitol positivo (FENG, 1995).

Outra característica bioquímica que pode ser empregada para distinguir as O157:H7 é a prova da β -D-Glucuronidase que é negativa neste sorotipo. Entretanto a prova é inútil para as STEC de outros sorogrupos (PATON; PATON, 1998b, KARCH et al., 1999a).

Para as STEC não-O157 as únicas alternativas são os métodos baseados na detecção da toxina Shiga ou a demonstração da presença dos genes *stx* por ser a única característica comum entre as STEC (KARCH et al., 1999a).

Em resumo, para o diagnóstico de infecção por STEC é necessário o isolamento da bactéria a partir de cultura convencional e a demonstração da produção de Stx, ou a detecção dos genes *stx*. Podem ser empregados para isto basicamente três métodos: o ensaio de citotoxicidade em células Vero e enzima imunoensaio (EIA) para a detecção de Stx e métodos moleculares para a detecção dos genes *stx* (PATON; PATON, 1998b; WHO, 1998).

O ensaio de citotoxicidade em células vero, embora apresente boa sensibilidade é demorado e requer a realização de cultivo celular, não disponível na maioria dos laboratórios clínicos. Os EIA estão disponíveis comercialmente e podem ser utilizados por laboratórios não especializados, entretanto não apresentam boa sensibilidade além de resultados falsos positivos, particularmente em amostras fecais. Os métodos moleculares podem ser empregados para a triagem dos diferentes tipos de STEC, e permitem a detecção de todos os genes *stx* (FENG, 1995; WHO, 1998). A Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction, PCR) representa um grande avanço no diagnóstico molecular de microorganismos patogênicos. Oligonucleotídeos iniciadores, moléculas que conferem a especificidade às reações de PCR, tem sido desenvolvidos para todas as categorias de *E. coli* diarreiogênicas. A principal vantagem da PCR é a sensibilidade (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, a PCR não deve ser utilizada para a detecção de patógenos diretamente da amostra. Seu uso é recomendado somente após o isolamento primário em meios adequados (WHO, 1998).

2.3 Métodos de Tipagem Bacteriana.

Os métodos de tipagem bacteriana são ferramentas essenciais nos estudos epidemiológicos, nos quais múltiplos isolados de uma mesma espécie são analisados para determinar se eles representam uma ou múltiplas estirpes. Os isolados epidemiologicamente não relacionados frequentemente diferem em várias características. Assim, os sistemas de tipagem são baseados na premissa de que isolados clonalmente relacionados compartilham características pelas quais eles podem ser diferenciados de isolados não relacionados. Uma estirpe é definida como um grupo de isolados que, analisado por um sistema de tipagem, é considerado indistinguível indicando que tais isolados são clonalmente relacionados.

A utilidade de uma característica particular para a tipagem bacteriana está relacionada com a sua estabilidade em uma estirpe e com a sua diversidade dentro da espécie (ARBËIT, 1995).

Os métodos de tipagem são classificados em duas categorias: métodos fenotípicos e métodos genotípicos.

Os métodos fenotípicos baseiam-se na detecção dos produtos expressos pelos microrganismos, e incluem a biotipagem, padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos, sorotipagem e fagotipagem.

A biotipagem utiliza o padrão de atividades metabólicas expressas por um organismo e permite incluir reações bioquímicas específicas, morfologia colonial, e tolerância a condições ambientais tais como a habilidade em crescer em certos meios de cultura ou em extremos de temperatura ou pH. É rotineiramente utilizada nos laboratórios clínicos. Variações na expressão gênica e mutações podem afetar a interpretação, o que ilustra tanto a utilidade limitada da biotipagem nos estudos epidemiológicos e o risco de tornar um sistema de identificação criticamente dependente de uma única característica.

Fácil de ser realizada e disponível nos laboratórios clínicos, a determinação do padrão de suscetibilidade a antimicrobianos apresenta uma utilidade limitada para muitos estudos epidemiológicos não somente porque os fenótipos podem variar, mas também devido a intensa pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos, estando a resistência frequentemente associada com elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons. Alterações no antibiograma também podem refletir mutações de ponto, como é observado nas fluoroquinolonas. Assim, isolados que são epidemiologicamente relacionados e de outra forma geneticamente indistinguíveis podem manifestar diferentes suscetibilidades aos antimicrobianos devido a aquisição de novo material genético ou a perda de plasmídios. E, ao contrário, isolados não relacionados podem apresentar o mesmo padrão de suscetibilidade, o que pode representar a aquisição do mesmo plasmídio por diversas estirpes.

A sorotipagem emprega uma série de anticorpos para detectar diferentes antígenos de superfície da célula bacteriana. Entretanto a necessidade de manter estoques de anticorpos capazes de detectar os possíveis antígenos bacterianos é a principal limitação dessa técnica, e que restringe seu emprego nos laboratórios. Na fagotipagem as estirpes são caracterizadas pelo padrão de resistência ou suscetibilidade a um conjunto de bacteriófagos. Devido a necessidade de manter estoques de fagos biologicamente ativos e estirpes controle, a fagotipagem só é realizada em laboratórios de referência (ARBEIT, 1995; TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

Os métodos genotípicos envolvem a análise de DNA cromossomal ou plasmidial. O perfil plasmidial foi o primeiro método molecular utilizado como ferramenta para a tipagem bacteriana (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

O termo plasmídio foi cunhado por Joshua Lederberg nos anos 50 para designar elementos genéticos extracromossômicos. A maioria dos plasmídios consiste de moléculas de DNA fita dupla e circular. São capazes de replicação autônoma. Além de conterem genes para sua própria replicação, muitos plasmídios frequentemente carregam genes que expressam características importantes para a célula bacteriana hospedeira como os genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência (NOLTE et al., 1984; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Estão presentes em muitas bactérias, especialmente nas gram negativas, como as Enterobacteriaceae que frequentemente apresentam um ou mais plasmídios (SHERLEY; GORDON; COLLIGNON, 2003).

Os plasmídios podem ser identificados prontamente por procedimentos que envolvem a lise celular seguidos pela eletroforese do lisado em gel de eletroforese. O número e tamanho dos plasmídios presentes são utilizados como base para a identificação das estirpes. Esta técnica de tipagem tem sido utilizada com sucesso na análise de surtos de infecção nosocomial e infecção adquirida na comunidade causada por uma variedade de bactérias ou ainda para documentar a persistência de uma determinada estirpe em um paciente (WACHSMUNT et al., 1991). Também é útil para a tipagem de várias espécies bacterianas incluindo *E.coli* (MEYERS et al., 1976; SCHABERG; TOMPKINS; FALKOW, 1981, NOLTE et al., 1984; PERSING et al., 1993; ISENBERG, 1994; TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

Esse método de tipagem apresenta limitações inerentes ao fato de que plasmídios são elementos extracromossomais móveis, que podem ser espontaneamente perdidos ou adquiridos por uma bactéria. Consequentemente isolados epidemiologicamente relacionados podem exibir perfis plasmidiais diferentes (ARBEIT, 1995).

2.4 Plasmídios encontrados em STEC

Plasmídios são os principais vetores para a disseminação da resistência antimicrobiana e de determinantes de virulência entre as populações bacterianas

(MARTÍNEZ; BAQUERO, 2002). Frequentemente as STEC contém plasmídios grandes que codificam produtos que podem atuar como fatores de virulência adicionais (KARCH et al., 1999b). Na maioria das STEC O157 e algumas não-O157 pode ser encontrado o plasmídio pO157, de aproximadamente 90 kb que contém o gene *hly* que codifica a enterohemolisina (SCHMIDT; KARCH; BEUTIN, 1994; GYLES et al., 1998; NATARO; KAPER, 1998; RADU et al., 2001).

Existem poucas informações sobre a variabilidade e distribuição dos plasmídios entre as estirpes STEC. Mas plasmídios com tamanho variando de 2 a 110 kb, heterogêneos quanto à composição gênica e arranjo, têm sido descritos em diferentes sorotipos de STEC (BRUNDER et al., 1999; ZHANG et al., 2000; TSCHÄPE; FRUTH; 2001; RADU et al., 2001; SONNTAG et al., 2004). Mais estudos são necessários para elucidar a variabilidade plasmidial e para determinar como variações na composição dos genes de virulência por eles carregados influenciam a patogenicidade individual de estirpes de STEC (BRUNDER et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Estudar a diversidade entre as estirpes de STEC visando obter dados que possam ser úteis para o diagnóstico microbiológico e estudos epidemiológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os biotipos das estirpes de STEC utilizando provas bioquímicas adequadas para a diferenciação das enterobactérias.
- Determinar o perfil de suscetibilidade das STEC aos antimicrobianos.
- Verificar a expressão de enterohemolisina.
- Determinar o perfil plasmidial das estirpes de STEC .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Foram analisadas 41 STEC, das quais 04 foram isoladas por DE TONI (2004) a partir de fezes de crianças com diarreia; e 37 foram isoladas por PIGATTO (2004) a partir de *swab* fecal de bovinos saudáveis. Todas foram classificadas como STEC não-O157. As bactérias foram estocadas em Tryptic Soy Agar (TSA) e mantidas entre 2°C e 8°C, e também em Tryptic Soy Broth (TSB) contendo 20% de glicerol e mantidas a -20°C.

4.2 Reagentes e meios de cultura

A procedência dos reagentes, meios de cultura, discos de açúcares e antimicrobianos utilizados estão descritos no ANEXO 1.

4.3 Condições de Cultivo

O cultivo das STEC foi realizado em TSA incubado a 36°C por 18-24 horas.

4.4 Provas bioquímicas utilizadas para a biotipagem

Foram realizadas provas bioquímicas clássicas, recomendadas para a diferenciação de enterobactérias, segundo a metodologia descrita em KONEMAN (1997) e MACFADDIN (2000). As provas realizadas foram: fenilalanina desaminase, urease, citrato, motilidade, gás, indol, H₂S, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, arginina descarboxilase, adonitol, arabinose, celobiose, dulcitol, inositol, lactose, maltose, melibiose, sacarose, salicina, sorbitol, rafinose, rhamnose, trealose e xilose. As estirpes de STEC foram cultivadas em TSA com 18-24 horas de antecedência à realização desses ensaios.

4.4.1 Ensaio da Fenilalanina desaminase

Esta prova baseia-se na desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina desaminase. A desaminação da fenilalanina resulta na formação de ácido fenilpirúvico e amônia. O ácido fenilpirúvico reage com íons férricos em meio ácido formando um complexo de cor verde. Essa enzima é produzida por algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae* como as do gênero *Proteus*, *Providencia* e *Morganella*.

Procedimento: o ágar fenilalanina foi preparado conforme as instruções do fabricante e distribuído em tubos de modo a obter uma superfície inclinada. Após a inoculação das bactérias, os tubos foram incubados por um período de 18 a 24 horas a 36°C. Após esse período foram adicionadas 5 gotas do reagente de cloreto férrico sobre a superfície do meio. O desenvolvimento de cor verde foi interpretado como prova positiva para a fenilalanina desaminase, e nenhuma mudança na coloração como prova negativa.

Como controles do ensaio foram utilizados *Proteus mirabilis* ATCC 43071 (controle positivo), e *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo).

4.4.2 Prova de utilização do Citrato

O princípio dessa prova é determinar se um organismo é capaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o crescimento. Assim, o meio empregado não deve conter qualquer tipo de proteína ou carboidrato. A fonte de nitrogênio presente é um sal de amônia. As bactérias que são capazes de crescer no agar citrato produzem enzimas que degradam o citrato de sódio gerando subprodutos alcalinos. Portanto, o aumento do pH do meio indica a degradação do citrato de sódio. O azul de bromotimol é utilizado como indicador de pH, é verde quando o pH está entre 6 e 7,6, torna-se azul em pH acima de 7,6 e amarelo quando o pH está abaixo de 6.

Procedimento: foi utilizado o ágar Citrato de Simmons, preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultivo foi distribuído em tubos que foram autoclavados e então deixados solidificar na posição inclinada. As bactérias foram inoculadas na superfície inclinada do ágar e incubadas a 36°C por 24 a 48 horas, mantendo a tampa do tubo frouxa. Interpretação: a ausência de crescimento

bacteriano indicou a prova negativa e o crescimento e/ou desenvolvimento da cor azul foi interpretado como prova positiva. Como controles foram utilizadas a *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (controle positivo).

4.4.3 Teste da Urease

Esse teste fundamenta-se na atividade da enzima urease que é capaz de hidrolisar uréia formando CO_2 e NH_3 . A presença da amônia promove o aumento do pH do meio. A variação de pH devido à presença de NH_3 pode ser observada na presença do indicador de pH vermelho de fenol.

Procedimento: o meio foi preparado segundo as instruções do fabricante, e após autoclavação e resfriamento em banho-maria 50°C foi adicionado de uma solução de uréia de modo a obter uma concentração final de 2%. O meio foi distribuído em tubos com tampa de rosca deixados para solidificar em posição inclinada. As bactérias foram inoculadas na superfície do ágar inclinado e incubadas a 36°C por 24 a 48 horas. Interpretação: crescimento e desenvolvimento de coloração rósea a vermelho indicou a presença da urease, crescimento sem alteração na coloração do meio foi considerado como prova negativa, ausência da enzima.

Como controles foram utilizados *Proteus mirabilis* ATCC 43071 (controle positivo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo).

4.4.4 Prova da Ornitina e Arginina Descarboxilases

Essa prova avalia a capacidade enzimática das bactérias em descarboxilar um aminoácido formando aminas e resultando na alcalinização do meio. A reação das descarboxilases específicas com os aminoácidos ornitina, arginina e lisina levam à formação das aminas putrescina para os dois primeiros, e cadaverina para o último.

O meio de cultivo utilizado para a prova de descarboxilação é o mesmo, variando apenas o aminoácido que se pretende testar. O indicador de pH púrpura de bromocresol, presente na composição do meio, apresenta a cor púrpura em pH superior a 6,8 e amarelo quando o pH é inferior a 5,2. A glicose, presente em

pequena quantidade no meio, é fermentada por todas as Enterobacteriaceae. Desta forma o desenvolvimento da cor amarela indica que o microrganismo inoculado está viável e não produz a descarboxilase específica para o aminoácido presente no meio. Se a bactéria produz descarboxilase a produção de aminas supera a acidez e reverte a cor do meio para a púrpura.

Procedimento: para esse ensaio foi utilizado o Caldo descarboxilase de Moeller. Os aminoácidos foram acrescentados ao meio base na proporção de 1 % e o pH ajustado em 6,0. Após a inoculação das bactérias, foi acrescentada vaselina líquida estéril para vedar a superfície do caldo. Os meios foram incubados a 36°C por 18 a 24 horas. A prova foi interpretada como positiva quando o meio apresentou desenvolvimento de cor púrpura, e negativa quando o meio apresentou desenvolvimento de cor amarela.

4.4.5 Prova de Voges-Proskauer

Esta prova é assim denominada em referência ao nome dos dois microbiologistas que observaram pela primeira vez que algumas bactérias cultivadas em meios contendo glicose apresentavam reação de cor vermelha quando eram tratadas com KOH. A degradação da glicose gera ácido pirúvico que é metabolizado de acordo com o sistema enzimático apresentado por diferentes bactérias. Uma das vias metabólicas utilizadas pelas Enterobacteriaceae resulta na produção de acetoína (acetil metil carbinol), um produto final de reação neutra. Em presença de oxigênio atmosférico a acetoína reage com KOH produzindo diacetil, que interage com peptonas do meio desenvolvendo uma coloração avermelhada. A reação é catalisada pelo α -naftol.

Procedimento: o meio de Clark e Lubs, utilizado para essa prova, foi preparado segundo instruções do fabricante. Após a inoculação e incubação por 18-24 horas a 36°C, foram adicionados ao meio, nesta ordem, 1,5 mL de solução de α -naftol (5 g de α -naftol em 100 mL de etanol absoluto) e 0,5 mL de KOH 40%. Os tubos foram agitados para expor o meio ao oxigênio atmosférico e o resultado da prova foi lido após 15 minutos. Interpretação: desenvolvimento de cor avermelhada foi considerado como indicador da produção de acetoína, portanto VP positivo, para os meios que não apresentaram alteração de cor a prova foi considerada negativa. O

controle positivo utilizado foi *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 e controle negativo a *Escherichia coli* ATCC 25922. Como controles foram utilizados *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (controle positivo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo).

4.4.6 Vermelho de metila (VM)

A prova do vermelho de metila indica a capacidade do microrganismo fermentar a glicose através da via dos ácidos mistos, gerando acidez suficiente para superar o sistema tampão do meio. O vermelho de metila é um indicador que detecta acidez em níveis mais baixos em relação aos outros indicadores usados em meios de cultura. Em pH 4 ou menos adquire cor vermelha.

Procedimento: o meio de Clark e Lubs é utilizado para essa prova. Após a inoculação e incubação a 36° C por 48 a 72 horas, foram adicionadas ao meio 3 gotas de uma solução hidroalcoólica de vermelho de metila a 0,05% . Foi considerada como positiva a prova que apresentou cor vermelha estável, e o desenvolvimento de cor amarela como prova negativa. O controle positivo utilizado foi a *Escherichia coli* ATCC 25922 e controle negativo *Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

4.4.7 MILI

Este meio foi desenvolvido para possibilitar a realização de três provas, Indol, Motilidade e Lisina descarboxilase em um único tubo. O indol é um produto de degradação metabólica do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase. O teste é baseado na formação de um complexo vermelho quando o indol formado reage com *p*-dimetilaminobenzaldeído presente no reativo de Kovacs.

O teste da motilidade indica se o microrganismo apresenta ou não flagelos. Essa característica permite à bactéria difundir-se através de ágar semi-sólido. A prova da lisina descarboxilase segue o mesmo princípio e interpretação descrita para a prova da ornitina e arginina descarboxilase (item 4.4.4).

Procedimento: o meio de MILI foi preparado como recomendado pelo fabricante, distribuído em tubos com tampa de rosca, autoclavado e resfriado em posição

vertical. Os meios inoculados foram incubados por 18-24 horas a 36°C. Após a incubação, um crescimento difuso por todo o meio foi interpretado como motilidade positiva e um crescimento limitado à linha de inoculação interpretado como motilidade negativa. A produção do indol foi verificada pela adição de 5 gotas do reativo de Kovacs. O desenvolvimento de uma coloração vermelha na superfície foi interpretado como prova positiva. Como controles foram utilizados *Escherichia coli* ATCC 25922 (positivo para as três provas), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (negativo para o indol e motilidade) e *Proteus mirabilis* ATCC 43071 (controle negativo da lisina descarboxilase).

4.4.8 Kliger Iron Agar (KIA)

Este meio fornece as provas de fermentação da glicose, lactose, produção de gás e liberação enzimática de H₂S. O tiosulfato de sódio e o sulfato ferroso são, respectivamente, o substrato e o indicador para a prova de formação de H₂S. A reação entre o sulfato ferroso e o H₂S em meio ácido resulta em sulfeto ferroso, um precipitado insolúvel e negro.

Outra característica revelada pelo KIA é a produção de gás a partir do metabolismo dos carboidratos. O desenvolvimento de bolhas no interior do meio ou o deslocamento do meio indicam a produção de CO₂ e O₂.

Procedimento: após o preparo alíquotas do meio foram distribuídas em tubos com tampa de rosca, autoclavados e deixados esfriar em posição inclinada. As bactérias foram inoculadas no interior e na superfície do KIA e incubadas por 18 a 24 horas a 36°C. As reações foram interpretadas de acordo com os critérios descritos abaixo:

As bactérias utilizadas como controles foram *Escherichia coli* ATCC 25922 (fermenta glicose e lactose, produz gás); *Proteus mirabilis* ATCC 43071 (produz H₂S) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (não fermenta carboidratos, não produz gás nem H₂S).

CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DO KIA

Base	Ápice	Interpretação
Amarela (ácido)	Amarelo (ácido)	Fermentação da Glicose e Lactose
Amarela (ácido)	Vermelho (alcalino)	Fermentação somente da Glicose
Bolhas ou descolamento do meio	-	Produção de Gás
Escurecimento do meio	-	Produção de H ₂ S

4.4.9 Fermentação de açúcares

Uma característica de grande valor para a identificação bacteriana é a capacidade de utilizar um determinado açúcar gerando subprodutos ácidos, cuja presença pode ser detectada pela adição de um indicador de pH.

Procedimento: foi utilizado o meio base Purple Broth ao qual foram adicionados discos de papel impregnados com açúcares. Após a inoculação foi adicionado 0,5 mL de vaselina líquida estéril a cada tubo. A incubação foi realizada a 35° C por 18 a 24 horas. Interpretação: se o açúcar foi utilizado a produção de ácidos leva à viragem do indicador de pH, mudando a coloração de púrpura para amarelo. Meio inalterado indica a não utilização do açúcar. Nas provas com resultado negativo, foi verificado o desenvolvimento de turvação para comprovar o crescimento bacteriano. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 foi usada como controle positivo e *Morganella morganii* ATCC 25830 como controle negativo.

4.5 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Foi utilizado o método de Kirby e Bauer (BAUER et al., 1966) baseado em disco difusão em ágar segundo os critérios estabelecidos pelo NCCLS (2003). Os antimicrobianos utilizados foram: Ácido Nalidíxico, Ampicilina, Cefalotina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Imipenem, Gentamicina, Nitrofurantoína, Tetraciclina, Sulfametoxazol+Trimetoprim, Estreptomicina.

O meio de cultura utilizado para a realização do teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi o ágar Mueller Hinton preparado conforme as instruções do

fabricante. Após a esterilização o meio foi mantido em banho-maria a 50°C e alíquotas de 60 mL foram distribuídas em placas de Petri de 150mm de diâmetro, de forma a obter uma espessura de aproximadamente 4 mm.

Para o preparo do inóculo foi utilizado o método do crescimento. Três a cinco colônias isoladas foram selecionadas de placa de pré-cultivo realizado em ágar TSA com 18-24 de antecedência, transferidas para um tubo contendo caldo Mueller Hinton e incubadas a 36°C por período de cerca de 1-3 horas. O meio foi então comparado com o tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a turvação produzida por aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia /mL. Nos casos com turvação superior ao padrão foi feito o ajuste com salina estéril. Um *swab* foi embebido no meio de cultivo e utilizado para inocular os microrganismos sobre toda a superfície do ágar Mueller Hinton. Os discos foram posicionados sobre a superfície do ágar com distância de 25 mm entre cada um. As placas foram incubadas a 36° por 18 horas em aerobiose, e os halos de inibição do crescimento foram medidos com régua de escala milimétrica. As medidas obtidas foram interpretadas como Sensível, Intermediário ou Resistente de acordo com as referências estabelecidas pelo NCCLS (2003). Como controle do ensaio foi utilizada a *E. coli* ATCC 25922.

4.6 Teste para detecção da enterohemolisina

O fenótipo enterohemolítico é caracterizado por zonas de hemólise pequenas e turvas que surgem após incubação a 36°C por 18 a 24 horas e que podem ser detectadas somente em placas de ágar sangue contendo eritrócitos lavados. Difere da α -hemolisina extracelular de *E.coli* que produz zonas de hemólise grandes e claras, detectáveis após 4 a 6 horas de incubação (KARCH et al., 1998). Para verificar a produção de enterohemolisina nas estirpes de STEC foi empregado o método desenvolvido por BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER (1996).

Procedimento: o meio Blood Agar Base (BAB) foi preparado conforme as instruções do fabricante. Após esterilização em autoclave o ágar foi mantido em banho-maria a 45°C. Após equilíbrio da temperatura, foi adicionado ao meio uma solução estéril de Cloreto de Cálcio 1M em quantidade suficiente para se obter concentração final de 10 mM e eritrócitos desfibrinados de carneiro lavados 3 vezes em PBS para

concentração final de 5%. A mistura foi homogeneizada e distribuída em placas de Petri identificadas como ASL (ágar sangue lavado). Paralelamente, para controle, foi preparado o ágar sangue (AS) utilizado na rotina, contendo BAB sem adição de cloreto de cálcio e acrescido 5% de sangue de carneiro não lavado.

Placas de ASL e de AS foram divididas em nove áreas onde as STEC foram inoculadas a partir de cultivo de TSA com 18-24 horas. As placas foram incubadas a 36°C e após 4 horas foi feita leitura para verificar a presença de hemólise. As colônias que apresentaram hemólise foram identificadas como produtoras de α -hemolisina, e as placas foram novamente incubadas. Após 18 horas foi realizada nova leitura para verificar a produção de enterohemolisina. Somente as estirpes que apresentaram uma zona pequena de hemólise apenas no ASL após 18 horas de incubação foram consideradas como produtoras de enterohemolisina. Como controle positivo e negativo foram utilizadas estirpes de STEC cujo genótipo para *hlyA* foi determinado por PCR.

4.7 Extração de DNA plasmidial

Para a realização do perfil plasmidial foram utilizados dois métodos de extração de DNA plasmidial, o método descrito por KADO e LIU (1981) e a mini prep alcalina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). Resumidamente, as culturas bacterianas são concentradas por centrifugação, e as células são lisadas pelo tratamento com detergente e álcali. Durante esse processo o DNA é desnaturado. As moléculas de DNA circulares dos plasmídios, cujas fitas estão entrelaçadas, voltam a renaturar após a neutralização do pH, o que não ocorre com o DNA cromossomal, que é quebrado durante o processo de extração e permanece desnaturado. Proteínas e restos celulares são removidos por extração com fenol-clorofórmio e o DNA plasmidial presente no extrato é precipitado com etanol.

4.7.1 Extração de DNA plasmidial segundo Kado e Liu

Reagentes:

Solução 1:	TE
Tris.HCl pH 8,0	10mM
EDTA	1mM

Solução 2:	Tampão de lise
Tris HCl pH7,5	50 mM
SDS	3 %
NaOH	82 mM

O tampão de lise foi preparado no momento do uso a partir de soluções estoque de Tris HCl 1M, SDS 10% e NaOH 2M.

Procedimento: Alíquotas de 1,5 mL das culturas de STEC realizadas em TSB foram transferidas para um tubo tipo *ependorf* com capacidade de 1,5 mL, e centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado, e ao sedimento foram adicionados 100 µL de TE seguido de homogeneização da mistura e adição de 200 µL de tampão de lise preparado na hora do uso. A mistura foi homogeneizada por inversão e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período foram adicionados 600 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico seguidos de homogeneização dos tubos por inversão cerca de 150 vezes. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm, e 250 µL do sobrenadante límpido foram transferidos para outro tubo ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto. Após homogeneização da mistura, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de etanol 80% seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos foram incubados a 36° C até a secagem do precipitado. O DNA precipitado foi dissolvido com 20 µL água ultra-pura estéril e acrescentado 1 µL de RNase 1mg/mL e a mistura foi incubada por 2 horas a 36°C. O material assim obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 0,7% em TBE 1X. A corrida eletroforética foi realizada a 36 V durante 6 horas e o gel corado com brometo de etideo 0,5 µg/mL, visualizado em transiluminador UV (Ultralum) e a imagem capturada pelo sistema Kodak Digital Science 1D.

4.7.2 Mini prep alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Reagentes

Solução 1 :	GET
Glucose	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Tris HCl pH 8,0	25 mM

A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e armazenada a 4°C.

Solução 2:	Tampão de Lise
NaOH	0,2 M
SDS	1%

O tampão de lise foi preparado no momento do uso a partir de soluções estoque de NaOH 2M e SDS 10%.

Solução 3:	KacF
Acetato de potássio	3 M
Acido fórmico	1,8 M

Procedimento: Aliquotas de 1,5 mL das culturas de STEC realizadas em TSB foram transferidas para um tubo tipo *ependorf* com capacidade de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante desprezado. O sedimento bacteriano foi suspenso em 100 µL de GET gelado, e adicionado de 200 µL de tampão de lise. A mistura foi homogeneizada por inversão e os tubos foram mantidos banho de gelo por 5 minutos. Após esse período foram adicionados 150 µL de KacF gelado, a mistura foi homogeneizada por inversão e o tubo foi novamente mantido em banho de gelo por 5 minutos. Então foram adicionados 50 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico seguido de homogeneização da mistura em vortex e centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante límpido foi transferido outro tubo e adicionado de 1 mL de etanol absoluto. Após homogeneização o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de etanol 80% seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo incubado a 36°C até secagem do precipitado que foi dissolvido com 20 µL água ultrapura estéril e

acrescentado de 1 μ L de RNase 1mg/mL seguido de incubação por 2 horas a 36° C. O material assim obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,7% em TBE 1X. A corrida eletroforética foi realizada a 36 V durante 6 horas e o gel corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL, visualizado em transiluminador UV (Ultralum) e a imagem capturada pelo sistema Kodak Digital Science 1D.

4.7.3 Estimativa do tamanho plasmidial

O tamanho dos plasmídios foi estimado utilizando análise de regressão múltipla com o logaritmo da massa molecular relacionado ao logaritmo da mobilidade relativa como proposto por ROCHELLE et al., (1985). Como marcadores para a estimativa do tamanho plasmidial, foram utilizados plasmídios de tamanho conhecido descrito na tabela1.

TABELA 1 - PLASMÍDIOS UTILIZADOS COMO MARCADORES PARA A ESTIMATIVA DO TAMANHO PLASMIDIAL

Plasmídio	Tamanho (kb)	Fonte
pCF3	6,2	FADEL-PICHETH, 2000.
pMYTc	10,5	ASSUMPÇÃO, M. C., 20041
pLAFR3	22	STASKAWICZ et al., 1987
pAB441	43	BOZOUKLIAN et al., 1986

¹ Comunicação pessoal.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização bioquímica

Para facilitar a análise do biotipo, à cada estirpe foi atribuída um código numérico de cinco algarismos gerado com base no resultado apenas das provas para as quais foi observada variabilidade entre as bactérias estudadas. As provas foram agrupadas como mostrado no quadro abaixo. Para as provas positivas foram atribuídos os valores especificados abaixo de cada uma delas, em caso negativo o valor considerado para cada prova foi zero. A soma de cada grupo de provas pode variar de 0 a 7, com exceção da última que pode ser 0 ou 1.

TABELA 2 - PROVAS BIOQUÍMICAS E CÓDIGO NUMÉRICO UTILIZADOS PARA A BIOTIPAGEM

Prova	Mot	Gás	ODC	Cel	Dul	Ino	Sac	Sal	Sor	Raf	Lis	Mal	Rha
Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
Soma	7			7			7			7			1

LEGENDA : Mot – Motilidade; Gas – Gás; ODC – Ornitina descarboxilase; Cel – Celobiose; Dul – Dulcitol; Ino – Inositol; Sac – Sacarose; Sal – Salicina; Sor – Sorbitol; Raf – Rafinose; Lis – Lisina descarboxilase; Mal – Maltose; Rha - Rhamnose

A utilização desse sistema permitiu que as 42 estirpes de STEC fossem classificadas em 17 biotipos diferentes, descritos na tabela 4.

Os resultados das provas bioquímicas estão indicados nas Tabelas 2 e 3, onde estão descritos por estirpe e em frequência, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram um perfil bioquímico compatível com *E. coli* quando os mesmos foram comparados com dados de literatura (FARMER III, 1995).

TABELA 3 - RESULTADO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS

Estirpe	FEN	CIT	URE	MOT	IND	GAS	H2S	VM	VP	ADC	LDC	ODC	ADO	ARA	CEL	DUL	GLI	INO	LAC	MAL	MEL	SAC	SAL	SOR	RAF	RHA	TRE	XIL
CP10	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CP11	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
CP13	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CP14	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
CP16	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
CP18	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP21(+)	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP21(-)	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP22	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP26	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP27	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP28	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
CP31	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP32	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP33	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP39	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CP41	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CP42	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CP43	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP44+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CP44-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP46	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP47	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP50+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP50-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP52	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP53	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CP61	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP66	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP67	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP70	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP78	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP104	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP113	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP114	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CP170	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CP178	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CP179	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M03	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
D104	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
J307/31	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
J307/5	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

LEGENDA: FEN- Fenilalanina desaminase; CIT- Citrato de Simons; URE- Urease; MOT-Motilidade; IND- Indol; GAS- Gás (KIA); H2S- Gás Sulfídrico; VM- Vermelho de Metila; VP- Voges-Proskauer; ADC- Arginina descarboxilase; LDC- Lisina descarboxilase; ODC- Ornitina descarboxilase; ADO- Adonitol; ARA- Arabinose; CEL-Celobiose; DUL-Dulcitol; GLI-Glicose; INO-Inositol; LAC-Lactose (KIA); MAL-Maltose; MEL-Melibiose; SAC- Sacarose; SAL-Salicin; SOR- Sorbitol; RAF-Rafinose; RHA- Ramnose; TRE-Trealose; XIL-Xilose.

TABELA 4 – RESULTADO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS COMPARADO COM O PERFIL DESCRITO PARA *E. coli**

PROVA	FREQUÊNCIA OBTIDA(%)	<i>E. coli</i> [#]	<i>E. coli</i> inativa [#]
Fenilalanina desaminase	0	0	0
Citrato de Simmons	0	1	1
Urease	0	1	1
Motilidade	90	95	5
Indol	100	98	80
Gás	95	95	5
Glicose	100	100	100
H ₂ S	0	1	1
VM	100	99	95
VP	0	0	0
Arginina descarboxilase	0	17	3
Lisina descarboxilase	93	90	40
Ornitina descarboxilase	88	65	20
Adonitol	0	5	3
Arabinose	100	99	85
Celobiose	5	2	2
Dulcitol	76	60	40
Inositol	2	1	1
Lactose	100	95	25
Maltose	98	95	80
Melibiose	100	75	40
Sacarose	74	50	15
Salicina	2	40	10
Sorbitol	81	94	75
Rafinose	88	50	15
Rhamnose	95	80	65
Trealose	100	98	90
Xilose	100	95	70

*Os números se referem ao percentual de positividade de cada prova. #Fonte: FARMER III, 1999.

TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE STEC DE ACORDO COM O BIOTIPO E RESPECTIVA FREQUÊNCIA

Biotipo	Número de estirpes	%
72571	11	26,2
72471	07	16,7
72171	06	14,3
70471	02	4,8
70571	02	4,8
52571	02	4,8
32461	02	4,8
70131	01	2,4
72561	01	2,4
76071	01	2,4
71571	01	2,4
62171	01	2,4
32571	01	2,4
70570*	01	2,4
60551*	01	2,4
20541*	01	2,4
20540*	01	2,4

*STEC isoladas de crianças com diarreia.

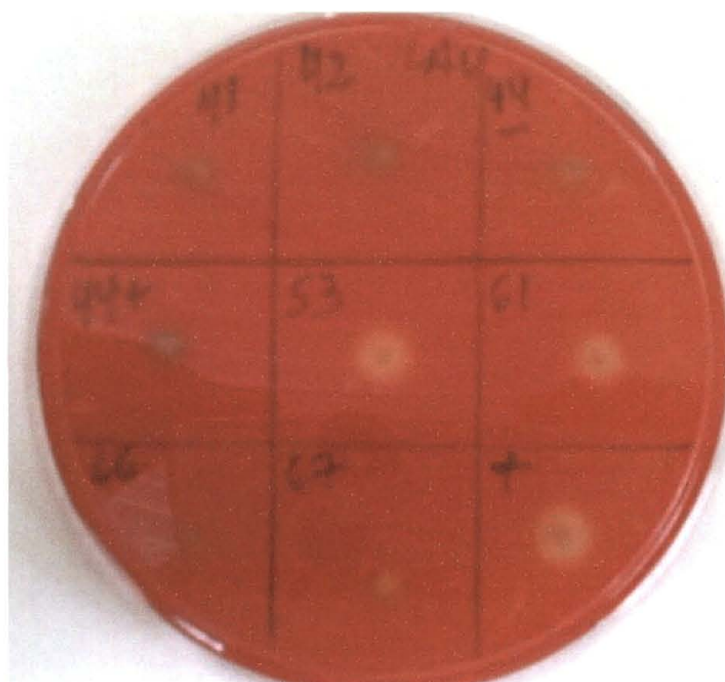
5.2 Suscetibilidade a antimicrobianos

A maioria das STEC isoladas de bovinos, 37 das 38 estirpes, mostrou-se sensível a todos os antimicrobianos testados. Uma delas apresentou resposta intermediária à ampicilina e cefalotina. Entre as 04 estirpes isoladas de humanos, três mostraram resistência à ampicilina, e uma apresentou resposta intermediária à esse mesmo antimicrobiano.

5.3 Produção de enterohemolisina

Entre as 42 STEC analisadas quanto à produção de enterohemolisina, 11 apresentaram o fenótipo esperado, isto é, a produção de uma região pequena e turva de hemólise em ASL após 18 a 24 horas de incubação a 36°C, como pode ser observado na figura 1. As STEC produtoras de enterohemolisina, representam 26,2% da amostra.

FIGURA 1 – FENÓTIPOS ENTEROHEMOLÍTICO E NÃO-ENTEROHEMOLÍTICO DE STEC



Ensaio para produção de enterohemolisina realizado em ágar sangue preparado com eritrócitos de carneiro lavados e CaCl₂. A produção de enterohemolisina é verificada pela presença de uma zona clara de hemólise ao redor de cada cultura, como pode ser observado nas áreas demarcadas como 53, 61, 67 e +. Fenótipo não-enterohemolítico é observado nas demais regiões da placa.

5.4 Perfil plasmidial

O perfil plasmidial é uma técnica na qual o número e o tamanho dos plasmídios presentes em um isolado podem ser determinados após a extração do DNA plasmidial e análise através de eletroforese. Neste trabalho dois métodos de extração plasmidial foram utilizados, o proposto por Kado e Liu (1981) e a “mini-prep” alcalina (SAMBROOK ; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Foram realizadas pelo menos duas extrações de DNA para cada estirpe de STEC utilizando ambos os métodos. A comparação entre as duas metodologias não mostrou diferenças significativas.

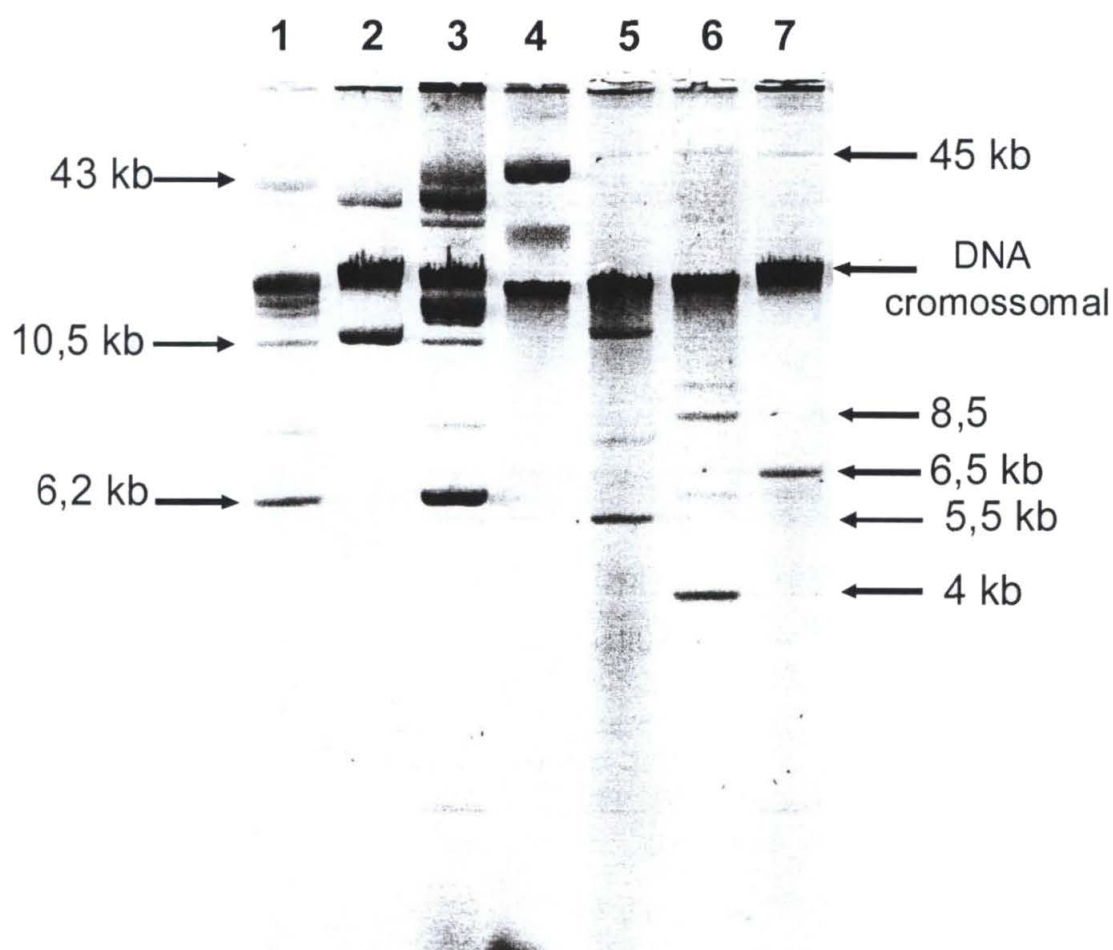
As figuras 2 a 4 representam os grupos principais dos perfis plasmidiais das estirpes estudadas. Uma estimativa do tamanho dos plasmídios foi realizada utilizando análise de regressão múltipla segundo ROCHELLE et al., 1985, utilizando os plasmídios pCF3, pLAFR, pMYTc e pAB441 como referência.

Além da presença de uma banda de DNA cromossomal, em algumas estirpes foram visualizadas múltiplas bandas de DNA o que dificultou a interpretação. Foram consideradas apenas as bandas que segundo descrição da literatura (WILLSHAW et al., 1979; MAYER, 1988) representam a forma circular fechada dos plasmídios. As bandas mais tênues e difusas representam as formas circular aberta ou linear dos plasmídios, e não foram consideradas nas análises.

As STEC foram classificadas em grupos de acordo com o número e tamanho dos plasmídios presentes. Apenas 4 estirpes não continham plasmídios (Grupo 0). Nas demais estirpes o número de plasmídios encontrados variou de 1 a 4 e em duas estirpes foram isolados 6 plasmídios (tabela 6).

O tamanho estimado dos plasmídios variou de 4 a 58 kb. Devido à elevada variação observada na estimativa dos tamanhos dos plasmídios, optou-se por utilizar como critério para classificação o tamanho dos plasmídios empregados como referência no estabelecimento da reta de regressão. Desta forma os plasmídios isolados das STEC foram classificados em 4 grupos de acordo com o tamanho: superior a 43 kb (37 plasmídios), acima de 10,5 kb até 22 kb (05 plasmídios); entre 6,2 a 10,5 kb (22 plasmídios) e abaixo de 6,2 kb (08 plasmídios). Nenhum plasmídio de tamanho estimado entre 22-43kb foi encontrado.

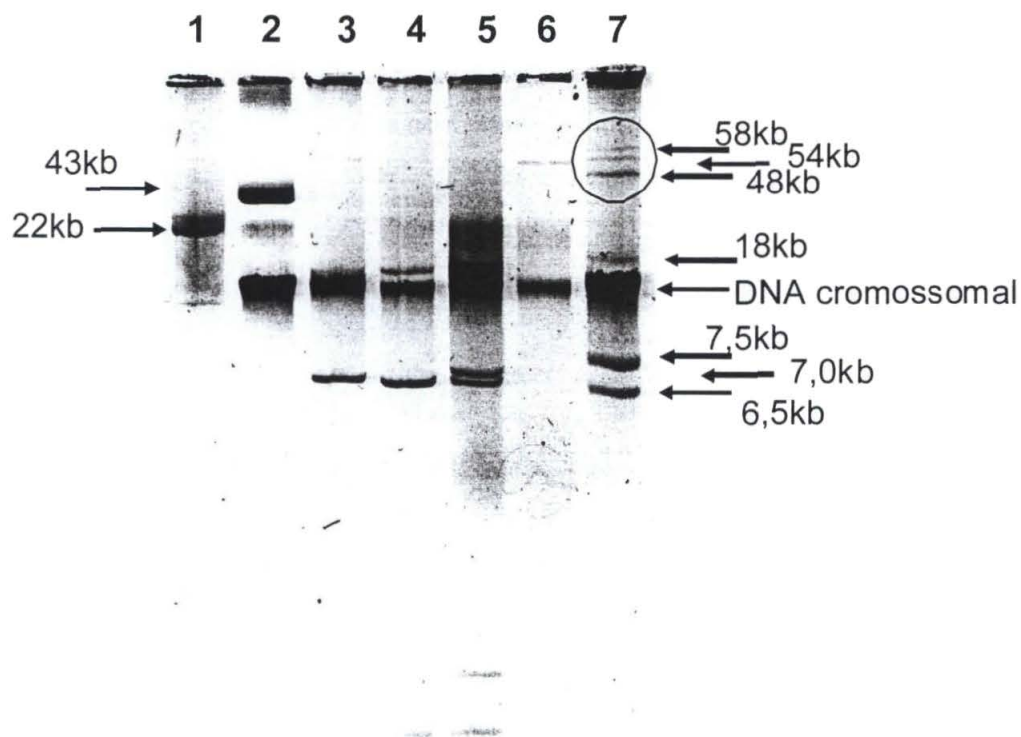
FIGURA 2. PERFIL PLASMIDIAL DE ESTIRPES DE STEC PERTENCENTES AOS GRUPOS IIa; IIb e IIIb.



Eletroforese em gel de agarose a 0,7% de DNA plasmidial purificado pelo método de Kado e Liu. 1. pCF3; 2. pMYTc; 3. pCF3; 4. pAB441; 5. CP21-1 (IIb); 6. CP21+1 (IIIb); 7. M03 (IIa).

As setas indicam o tamanho estimado dos plasmídios na forma circular fechada.

FIGURA 3. PERFIL PLASMIDIAL DE ESTIRPES DE STEC PERTENCENTES AOS GRUPOS I; IIa; IIc; II d e Va.



Eletroforese em gel de agarose a 0,7% de DNA plasmidial purificado pelo método da mini-prep alcalina. 1. pLAFR; 2. pAB441; 3. CP10 (IIa), 4. CP31 (II d); 5. CP39 (IIc); 6. CP44+ (I); 7. CP46+3 (Va). As setas indicam o tamanho estimado dos plasmídios na forma circular fechada. O círculo destaca 3 plasmídios com tamanho > 43 kb.

FIGURA 4. PERFIL PLASMIDIAL DE ESTIRPES DE STEC PERTENCENTES AOS GRUPOS I, IIa, IIIa e IV.



Eletoforese em gel de agarose a 0,7% de DNA plasmidial purificado pelo método de Kado e Liu. 1. pCF3; 2. pMYTc; 3. pAB441, 4. CP31+ (IIa); 5. CP46+ (IV); 6. CP11+1 (IIIa); 7. CP61 (I); 8. CP39+1 (IIa). As setas indicam o tamanho estimado dos plasmídios na forma circular fechada. O círculo destaca 2 plasmídios com tamanho ≥ 43 kb.

As figuras 5 e 6 ilustram a frequência dos plasmídios presentes nas estirpes de STEC de acordo com o número ou tamanho.

FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS PLASMÍDIOS NAS ESTIRPES DE STEC DE ACORDO COM O NÚMERO OBSERVADO.

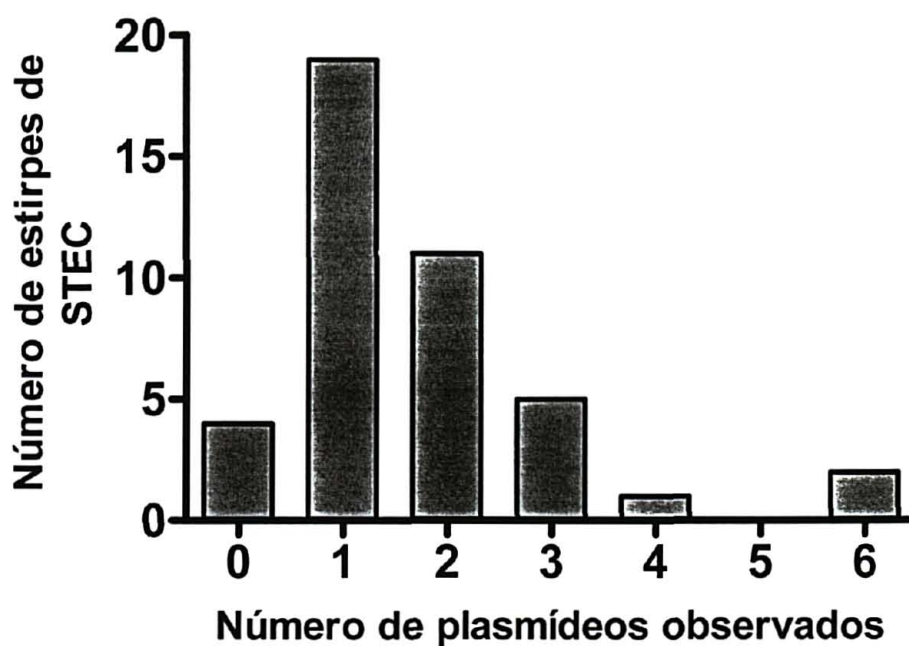


FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PLASMÍDIOS NAS ESTIRPES DE STEC DE ACORDO COM O TAMANHO

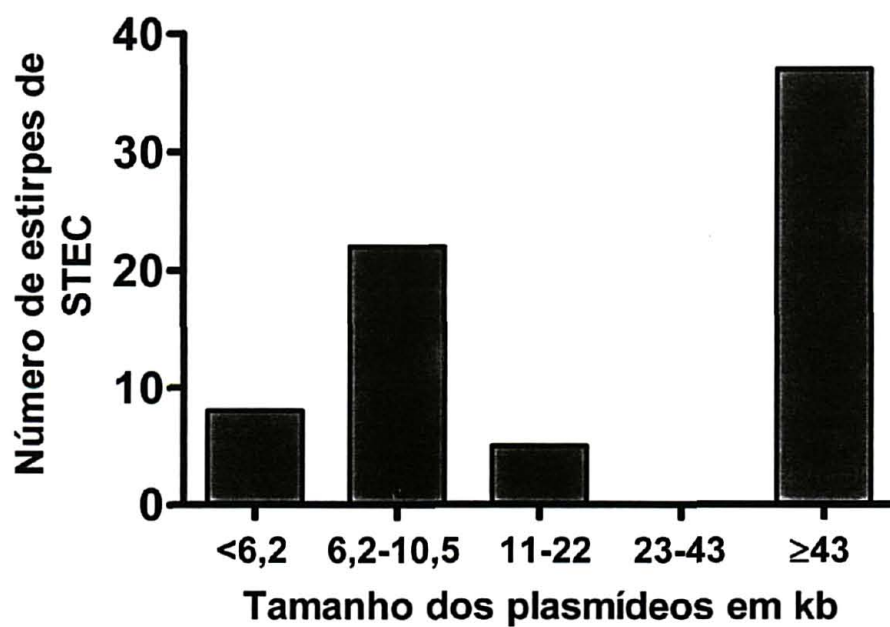


TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO DAS STEC DE ACORDO COM O PERFIL PLASMIDIAL E VARIAÇÃO NO TAMANHO DOS PLASMÍDIOS

Grupo	Nº. de plasmídios	Tamanho (kb)	Nº de estirpes
0	Não contém plasmídios	-	04
I	01	>43	19
II	a	02 1 plasmídio .> 43 1 plasmídio 6,2-10,5	05
	b	02 1 plasmídio > 43 1 plasmídio < 6,2	02
	c	02 2 plasmídios 6,2-10,5	01
	d	02 1 plasmídio >10,5-22 1 plasmídio 6,2-10,5	02
III	a	03 2 plasmídios > 43 1 plasmídios < 6,2	01
	b	03 1 plasmídio > 43 1 plasmídio 6,2-10,5 1 plasmídios < 6,2	02
	c	03 1 plasmídio >43 1 plasmídio >10,5-22 1 plasmídio 6,2-10,5	01
	d	03 2 plasmídios 6,2-10,5 1 plasmídio < 6,2	01
IV	04	1 plasmídio >43 1 plasmídio >10,5-22 2 plasmídios 6,2-10,5	01
V	a	06 3 plasmídios > 43 1 plasmídio >10,5-22 2 plasmídios 6,2-10,5	01
	b	06 1 plasmídio > 43 3 plasmídios 6,2-10,5 2 plasmídios < 6,2	01

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS STEC CONSIDERANDO O PERFIL PLASMIDIAL, BIOTIPOS, E PRODUÇÃO DE ENTEROHEMOLISINA.

Número de plasmídios	Produção de enterohemolisina*	Biotipos
0	-	72471; 72171
1	+ (8 estirpes)	72571; 72471; 70471; 52571; 32461
	-	72571;72561;71571;70571;70471;62171; 32571;32461
2	+ (2 estirpes)	72571; 70571
	-	76071;72571 [#] ;70570 [#] ;72171;72471;70570;60551
3	+ (1 estirpe)	72171
	-	72571;72471;70131;60551 [#] ;20540 [#]
4	-	72171
6	-	72471; 20541 [#]

*todas as estirpes produtoras de enterohemolisina apresentaram plasmídios com tamanho superior a 43 kb.

[#]estirpes com resistência ou resposta intermediária a ampicilina ou cefalotina.

6 DISCUSSÃO

6.1 Métodos fenotípicos

A maioria dos estudos sobre STEC tem sido realizada com um grupo restrito desses microrganismos, no qual se destaca o sorotipo O157:H7, e mais recentemente alguns representantes das não-O157 como os sorogrupos O26, O103, O111 e O145 (SCHMIDT; KARCH, 1996; SCHMIDT et al., 1999; ZHANG et al., 2000; SONNTAG et al., 2004).

Considerando que mais de 100 sorogrupos de STEC já foram reconhecidos como causa de doença em humanos (WHO, 1998; PATON; PATON, 1998b) e tendo em vista a crescente incidência de infecções provocadas pelas STEC não-O157, surge a necessidade de se obter maior conhecimento sobre características desses microrganismos que possam ser utilizadas com fins diagnósticos e epidemiológicos. Apesar dos consideráveis avanços nos métodos de diagnóstico para STEC, a detecção das estirpes não-O157 ainda representa um desafio para os laboratórios de microbiologia.

Vários métodos têm sido utilizados para a identificação bacteriana e a diferenciação de isolados clínicos. Os métodos fenotípicos baseiam-se nas atividades metabólicas ou biológicas expressas pelos microrganismos. São amplamente utilizados na rotina laboratorial, embora sejam inerentemente limitados pela capacidade dos organismos em alterar a expressão gênica, o que pode ocorrer de forma imprevisível ou em resposta a vários estímulos ambientais. Os métodos moleculares, baseados em análise de DNA, são valiosos para o diagnóstico das infecções, especialmente nas situações onde não é possível distinguir entre estirpes patogênicas e não patogênicas de uma determinada espécie. Isso ocorre com muitas das estirpes de *E. coli* que causam diarreia e que são bioquimicamente indistinguíveis daquelas da microbiota fecal normal, o que dificulta ou praticamente inviabiliza a sua detecção pelos métodos microbiológicos convencionais (NATARO; KAPER, 1998; MATHEMA; KREISWIRTH, 2003).

A aplicação dos métodos moleculares ao diagnóstico das STEC foi essencial para confirmar o papel das estirpes não-O157 como agentes de doença, através da detecção dos genes *stx*. Esses métodos também têm contribuído para um melhor conhecimento desses patógenos através da detecção de genes associados com

virulência, o que pode auxiliar na discriminação das estirpes mais virulentas para humanos daquelas não virulentas ou menos virulentas.

Este trabalho, realizado com 42 estirpes de STEC não-O157 isoladas no Paraná, teve por finalidade o estudo de características fenotípicas como a diversidade metabólica e a produção de enterohemolisina; e a determinação do perfil plasmidial.

A utilização de um painel com 28 provas bioquímicas, cujos resultados estão indicados nas tabelas 2 e 3, permitiu avaliar a variabilidade no comportamento metabólico das STEC. Os resultados obtidos, quando comparados àqueles da literatura (tabela 3) confirmam a identificação das bactérias estudadas como *E. coli*. A variabilidade no perfil metabólico levou à classificação das STEC em 17 biotipos distintos, como mostra a tabela 5. Cerca de 57% das STEC pertencem a 3 biotipos mais freqüentes. O padrão de comportamento bioquímico similar ao da maioria das *E. coli* já foi citado na literatura (KARCH et al., 1999a; FEY et al., 2000; LECLERCQ, 2001), e não permite distinguir as STEC das demais estirpes de *E. coli*.

Os métodos baseados em características fenotípicas têm aplicações limitadas, embora possam ser úteis em determinadas situações. Um exemplo é o padrão da maioria das STEC O157:H7 que não utilizam o sorbitol, característica que tem sido empregada no diagnóstico desse grupo de STEC (KARCH et al., 1999b). Outra característica fenotípica, a inabilidade de descarboxilar a lisina, tem sido utilizada como marcador das STEC O111 (GUTH et al., 2002a; GUTH et al., 2003b; VAZ et al., 2004). Tendo em vista esse aspecto, o comportamento das STEC analisadas neste trabalho merece algumas considerações. Para a maioria das provas empregadas o comportamento das STEC foi similar ao das *E. coli* típicas (tabelas 3 e 4). Entretanto quando se considera o resultado apresentado frente à arginina e à salicina, dois substratos que não são utilizados de rotina nos sistemas de identificação empregados rotineiramente nos laboratórios clínicos, observa-se uma alteração no padrão de comportamento, tornando-as mais parecidas às *E. coli* inativas (tabela 3). Embora o número de STEC analisadas neste estudo seja relativamente baixo, nenhuma delas foi capaz de descarboxilar a arginina, o que é realizado por 3% das *E. coli* inativas. Quando se considera a salicina, apenas 1 das 42 STEC foi capaz de metabolizar esse substrato, ou seja, apenas 2% das STEC estudadas, frente a 10% para as *E. coli* inativas. Esses resultados merecem um novo estudo utilizando maior número de STEC, e, se confirmados, as provas de

utilização da salicina e descarboxilação da arginina poderiam ser úteis na detecção desses patógenos.

Os resultados também mostram que as provas do sorbitol e da lactose, muitas vezes utilizadas para discriminar as estirpes de *E. coli*, não são úteis no caso das STEC não-O157. O fato de que a maioria das STEC foi capaz de descarboxilar a lisina sugere que o sorogrupo O111 não seja predominante nas estirpes estudadas. As quatro STEC isoladas de crianças (tabela 4) apresentaram perfil bioquímico distinto, não similar à nenhuma das isoladas de bovinos. Esses dados reforçam o fato de que as populações de *E. coli* são dotadas de uma diversidade substancial, o que dificulta a identificação de muitas estirpes patogênicas (HARTL; DYKHUIZEM, 1984; ARBEIT, 1995).

Embora a terapia antimicrobiana não seja recomendada nas infecções causadas por STEC, os resultados dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos podem ser indicadores úteis nos estudos epidemiológicos e também permitem monitorar as alterações no padrão de sensibilidade ao longo do tempo.

O surgimento de STEC multirresistentes já foi descrito na Europa, onde algumas estirpes desenvolveram resistência a estreptomicina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfonamidas, cloranfenicol, ampicilina e gentamicina. Esse mesmo padrão de resistência foi detectado tanto em estirpes isoladas de bovinos quanto de humanos (MAIDHOF et al., 2002). No Brasil estirpes multirresistentes foram detectadas em estirpes de STEC O111 isoladas de humanos. Apresentavam resistência a grupos de 3 a 6 antimicrobianos que incluem tetraciclina, estreptomicina, kanamicina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim. Resistência a pelo menos uma droga foi identificada em 52% das estirpes (VAZ et al., 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que 88% das STEC foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados (item 5.2). Considerando apenas as STEC isoladas de bovinos, esse índice é de 97% o que sugere que essas estirpes ainda não foram submetidas à pressão seletiva dos antimicrobianos. Apenas uma das estirpes isolada de bovinos não foi suscetível a todos os antimicrobianos testados e apresentou resposta intermediária à ampicilina e cefalotina. Provavelmente isso se deve ao fato de que no Brasil o gado é mantido no pasto, diferente do que ocorre em muitos outros países onde a alimentação é baseada em ração, que frequentemente é suplementada com antimicrobianos que são utilizados como "fator de crescimento".

As STEC isoladas de crianças mostraram resistência, ou resposta intermediária à ampicilina (item 5.2). Este padrão é comum nas *E. coli* isoladas de infecções em humanos e já foi reportada entre as STEC (EKLUND et al., 2001; SCHROEDER et al., 2002; GUTH et al., 2003a). A resistência ou a resposta intermediária à ampicilina e cefalotina não foi associada a nenhum biotipo ou perfil plasmidial específico (tabela 6).

A produção de enterohemolisina tem sido utilizada por alguns microbiologistas como um método alternativo ou auxiliar para o isolamento de STEC não-O157. A simplicidade do ensaio torna-o adequado para uso rotineiro nos laboratórios (KARCH et al., 1999a). Entretanto, a frequência com que esta característica é detectada entre as STEC não-O157 é bastante variável, e aparentemente a distribuição da enterohemolisina ocorre de forma heterogênea entre os diferentes sorogrupos (GYLES et al., 1998; SCHMIDT et al., 1999). Em estudos realizados com STEC isoladas de humanos, enquanto a produção de enterohemolisina é comum entre as estirpes do sorogrupo O145 e O26, parece ser uma característica heterogênea para as do sorogrupo O111 (SCHMIDT; KARCH, 1996; ZHANG et al., 2000; GUTH et al., 2002a; SONNTAG et al., 2004; VAZ et al., 2004).

Estudos realizados com estirpes isoladas de animais a distribuição da enterohemolisina também parece ser heterogênea (VETTORATO et al., 2003; MERCADO et al., 2004). Os resultados deste trabalho mostram que 11 das 42 estirpes analisadas são produtoras de enterohemolisina (figura 1), o que corresponde a 26% da amostra. Este resultado é similar ao encontrado em outro estudo realizado no país, onde a frequência de estirpes produtoras de enterohemolisina foi de 33% (VETTORATO et al., 2003).

Considerando que a expressão da enterohemolisina é mais comum nas STEC isoladas de pacientes com síndrome urêmica-hemolítica do que naquelas isoladas de casos de diarreia, foi sugerido que a sua presença aumente a habilidade das STEC em causar complicações extraintestinais em humanos (SCHMIDT; KARCH, 1996). Portanto as 11 estirpes que apresentaram essa característica devem ser consideradas como portadoras de um potencial patogênico mais elevado, representando maior risco para a saúde humana. Nenhuma das estirpes isoladas de humanas expressou a enterohemolisina, o que não é inesperado uma vez que todas foram isoladas de casos de diarreia não complicada (DE TONI, 2004).

A produção de enterohemolisina não foi associada a um biotipo específico, mas ocorreu somente em estirpes que continham plasmídios com tamanho superior a 43 kb (tabela 6). Esse resultado era esperado uma vez que o gene *hlyA*, que codifica a enterohemolisina, apresenta localização plasmidial e é frequentemente encontrado em plasmídios grandes, embora heterogêneos na sua composição (BOERLIN et al., 1998; BRUNDER et al., 1999).

6.1.1 Perfil Plasmidial

A presença de plasmídios nas bactérias é comum, especialmente nos gram negativos. A presença de plasmídios nas STEC também é comum, e eles podem ser encontrados isoladamente ou em combinação com outros plasmídios de tamanhos variados (RADU et al., 2001; SHERLEY; GORDON; COLLIGNON; 2003; SONNTAG et al., 2004).

A heterogeneidade na distribuição dos plasmídios entre as STEC sugere que a análise do perfil plasmidial possa ser útil como método de tipagem dessas bactérias. O conteúdo plasmidial da maioria das bactérias geralmente é uma característica estável, embora existam situações onde os plasmídios são perdidos durante os sub-cultivos. Mas em geral o conteúdo plasmidial é estável, mesmo na ausência de pressão seletiva (MAYER, 1988). Como características importantes como a resistência a antimicrobianos e fatores de virulência frequentemente são codificados em plasmídios, os resultados de tais análises podem resultar em aplicações que tenham valor diagnóstico.

Embora a análise do perfil plasmidial seja um método relativamente simples, a sua aplicação no estudo de estirpes selvagens, cuja composição plasmidial é desconhecida, apresenta limitações e dificuldades na interpretação. Esse método não permite uma caracterização precisa dos plasmídios, mas fornece informação sobre o conteúdo plasmidial de estirpes de bactérias, sendo um auxiliar importante na análise genética e nas investigações epidemiológicas (MEYERS et al., 1976).

As estirpes de STEC estudadas neste trabalho mostraram notável variação em relação à presença de plasmídios. Quatro delas não continham plasmídios, e as outras 38 foram classificadas em 5 grupos principais de acordo com o número de plasmídios presentes (tabela 5).

Entre as dificuldades enfrentadas, um dos fatores que pode afetar a análise é a quantidade de DNA. O efeito da concentração de DNA, cujo rendimento varia nas diferentes preparações, pode interferir com a detecção de plasmídios presentes em baixo número nas células. A presença de DNA cromossomal é outro fator que pode interferir com a análise. Os métodos rápidos de extração de DNA plasmidial frequentemente resultam em produtos que ainda contém DNA cromossomal, que geralmente aparece como uma banda irregular no gel (MEYER et al., 1976; MAYER, 1988). Isto ocorre porque o cromossomo é quebrado em fragmentos de tamanhos irregulares durante o processo de extração, gerando a formação de bandas mal delineadas. A intensidade e tamanho da banda de DNA cromossomal podem interferir com a detecção de plasmídios que migram na mesma região do gel, obscurecendo a sua presença. As figuras 3 (linhas 4 e 7) e 4 (linha 5) mostram plasmídios que migram próximo ao DNA cromossomal. Para essas amostras várias análises foram feitas para permitir melhor visualização das bandas.

Outro fator que pode interferir na detecção e identificação dos plasmídios é a presença de múltiplas formas de DNA plasmidial, que pode ser encontrado em três conformações: circular fechado covalentemente ou "supercoiled" (CCC), circular aberto - "nicked" (OC), ou linear. As três conformações apresentam diferentes mobilidades na eletroforese em gel de agarose, que dependem primariamente da concentração da agarose, campo elétrico e tamanho do DNA. Em geral a forma circular aberta migra mais lentamente que a forma circular covalentemente fechada, que aparece como uma banda mais intensa e com maior mobilidade. A migração da forma linear pode ocorrer adiante da circular fechada ou entre as formas circular fechada e circular aberta, dependendo do tamanho plasmidial (MEYER et al., 1976; WILLSHAW et al., 1979). A presença dessas formas variou nas diferentes preparações e estirpes e dificultou a interpretação dos resultados. Exemplos dessas formas podem ser observadas nas figuras 2 (linhas 5 e 6), 3 (linhas 4 a 6) e 4 (linhas 5, 6, e 8). Também não se pode descartar a presença de concatâmeros.

Segundo WILLSHAW et al., (1979), contrariamente ao que é observado com plasmídios pequenos, moléculas circulares abertas geralmente não são detectadas durante a eletroforese de plasmídios grandes. A maioria das estirpes que contém plasmídios grandes apresenta apenas uma banda na região do gel acima do plasmídio de 43 kb (figuras 2 a 4). Apenas duas estirpes, figuras 3 (linha 7) e 4 (linha

6) contêm mais de uma banda naquela região. Como o perfil mostrado foi reprodutível, as bandas foram consideradas como plasmídios de tamanhos distintos.

Devido ao pequeno número de plasmídios utilizados como marcadores, a ausência de marcadores de tamanho maior que 43 kb, a faixa de resolução e tempo de corrida da eletroforese, além da variabilidade inerente ao método utilizado para a estimativa do tamanho plasmidial, não se pode descartar que os plasmídios maiores (>43 kb) representem aqueles de 90 kb frequentemente encontrados nas STEC, e que comumente codificam a enterohemolisina e outros fatores associados com virulência. Esses plasmídios foram encontrados isoladamente ou em combinação (figura 5 e tabela 5), e representam 51,4% dos plasmídios isolados das estirpes estudadas (figura 7). Foram encontrados em 79% das estirpes de STEC. O segundo grupo mais comum apresenta tamanho estimado entre 6,2 a 10,5 kb, e representa 30,5% dos plasmídios encontrados. Foram encontrados em 36% das estirpes. Neste grupo, muitos plasmídios apresentaram tamanho próximo a 7 kb, e podem ser similares ao pColD157 encontrado nas STEC O157 e que codifica uma bacteriocina. O pColD157 apresenta 6,7 kb e codifica uma colicina e os fatores que conferem imunidade a ela. Esta característica pode conferir uma vantagem seletiva à estas bactérias pela inibição da flora normal do intestino ou durante a rota de transmissão fecal-oral (HOFINGER et al., 1998).

STEC apresentando 1 a 5 plasmídios já foram descritas, a maioria continha 1 plasmídio grande isolado ou em combinação com plasmídios menores. A presença de dois ou três plasmídios grandes também já foi relatada (SCHMIDT, KARCH, 1996; BRUNDER et al., 1999; ZHANG et al., 2000; RADU et al., 2001; SONNTAG et al., 2004). A variabilidade observada neste trabalho no perfil plasmidial das STEC fornece subsídios para a utilização desse método de tipagem em estudos epidemiológicos.

7 CONCLUSÕES

- As estirpes de STEC foram classificadas em 17 biotipos com base na diversidade do comportamento bioquímico.
- A maioria das STEC isoladas de bovinos foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. As estirpes isoladas de humanos foram resistentes ou apresentaram resposta intermediária à ampicilina.
- A produção de enterohemolisina foi observada em 11 das 42 estirpes de STEC.
- Foi observada uma notável heterogeneidade no perfil plasmidial das STEC em relação ao número, tamanho e combinações de plasmídios.

REFERÊNCIAS

- ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed , Washington,: ASM Press, 1995. p.190-208.
- ARTHUR, T. M., BARKOCY-GALLAGHER, G. A., RIVERA-BETANCOURT, M., KOOHMARAEIE, M. Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants. **App. Env. Microbiol.** v. 68, n.10, p. 4847-4852, 2002.
- BASTIAN, S. N.; CARLE, I.; GRIMONT, F. Comparison of 14 PCR Systems for the Detection and Subtyping of stx Genes in Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, n. 149, p. 457-472, 1998.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standartized Single Disk Method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496. 1966.
- BERKELMAN, R. L. In: HORSBURGH JR., C. R.; NELSON, A. M. **Pathology of Emerging Infections**. ASM Press, Washington, 1997. p.1 - 5.
- BEUTIM, L. ; MONTENEGRO, M. A. ; ORSKOV, I. ; ORSKOV, F. ; PRADA , J. ; ZIMMERMANN, S. ; STEPHAN, R. Close Association of Verotoxin (Shiga-like toxin) Production with Enterohemolysin Production in Strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 11, p. 2559-2564, 1989.
- BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K.. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2821-2814, 1996.
- BOERLIN, P.; CHEN, S.; COLBOURNE, J. K.; JOHNSON, R.; DE GRANDIS, S.; GYLES, C. Evolution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin Plasmids and the Locus for Enterocyte Effacement in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2553-2561, 1998.
- BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999.
- BONNET, R.; SOUWEINE, B.; GAUTHIER, G.; RICH, C.; LIVRELLI, V.; SiROT, J.; FORESTIER, C. Non-O157:H7 Stx2-Procucing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome in Adults. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n. 6, p. 1777-1780, 1998.

BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington, D.C : ASM, 1999. p. 459-474.

BOZOUKLIAN, H.; FOGHER, C.; ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.** v.137B, p. 3-18, 1986.

BRUNDER, W.; SCHIMIDT, H.; FROSCH, M.; KARCH, H. The Large Plasmids of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) are Highly Variable Genetic Elements. **Microbiology**, v. 145, n.5, p.1005-1014, 1999.

BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N.T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H. J.; BLATTNER, F. R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. **Nucl. Acids Res.**, v. 26, n. 18, p. 4196-4204, 1998.

BURNENS, A. P.; ZBINDEN, R.; KAEMPF, L.; HEINZER, I.; NICOLET, J. A Case of Laboratory Acquired Infection with *Escherichia coli* O157:H7. **Zbl. Bakt.** n. 279, p. 512-517, 1993.

CDC *Escherichia coli* O157:H7, Disponível
http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm Acesso em : 13 Jul 2003.

CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T.; CAUDURO, P. F.; DIAS, C. A. G.; MEZZARI, A.; BRODT, T. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Serotype O91:H21 from a Child with Diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 266-270, 2000.

CERQUEIRA, A.M.F. ; GUTH, B. E. C-. ; JOAQUIM, R. M. ; ANDRADE, J. R. C. High Occurrence of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Healthy Cattle in Rio de Janeiro State, Brazil , **Vet. Microbiol.** , v.70, p.111-121, 1999.

DE TONI, F. ***Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) em Crianças no Estado do Paraná** . Curitiba, 2004, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Paraná.

DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; KLASSEN, G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, C. R.; PICHETH, G.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T Detecção de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. **RBAC**, v.36, p.73-77, 2004.

DIEZ-GONZALEZ, F.; CALLAWAY, T.R.; KIZOULIS, M.G.; RUSSEL, J.B. Grain Feeding and the Dissemination of Acid-Resistant *Escherichia coli* from Cattle. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1666-1668, 1998.

DONNENBERG, M. S. ; WHITTAM, T. S. Patogenesis and Evolution of Virulence in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001.

DOUGAN, G.; HAQUE, A; PICKARD, D. ; FRANKEL, G.; O'GOARA, P.; WAIN, J. The *Escherichia coli* gene pool. **Curr. Opinion. Microbiol.**, v.4, p.90-94, 2001.

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* Strains Carrying *stx* Genes: *stx* Variants and *stx*-Positive Virulence Profiles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4585-4593, 2002.

EKLUND, M.; SCHEUTZ, F.; SIITONEN, A. Clinical Isolates of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Serotypes, Virulence Characteristics, and Molecular Profiles of Strains of the Same Serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2829-2834, 2001.

EUZEBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, n. 2, p. 590-592, 1997.

FADEL-PICHETH, C. M. T. **Análise estrutural e funcional da região promotora do gene *nifA* de *Azospirillum brasilense*.** Tese. (doutorado em Ciências – Bioquímica e Biologia Molecular). Setor de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 108p., 2000.

FARMER III, J. J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: Murray, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed , Washington D.C.: ASM Press, 1995, p. 438-449.

FEY, P. D.; WICKERT, R. S.; RUPP, M. E.; SAFRANEK, T. J.; HINRICHS, S. H. Prevalence of Non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool Samples from Nebraska. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, n. 5, p. 530-533, 2000.

FENG, P. *Escherichia coli* O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. **Emerg. Infect. Dis.**, v.1, n. 2, 1995.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil Textbook of Medicine**. 21 ed , Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000, 856 p.

GORDEN, J.; SMALL, P. L. C. Acid Resistance in Enteric Bacteria. **Infect. Immun.** v. 61, p. 364-367, 1993.

GRAY, L. D. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. In: Murray, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed. Washington, D.C.:ASM Press, 1995, p. 450-456.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7, other Enterohemorrhagic *E.coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome, **Epid. Rev.**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUTH, B. E. C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A. M.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J. R.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga Toxin Genotypes among *Escherichia coli* Isolated from Animals and Food in Argentina and Brazil, **Vet. Microbiol.**, v. 92, n. 4, p. 335-49, 2003a.

GUTH, B. E. C.; GOMES, T. A. T.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Inability to Decarboxylate Lysine as a Presumptive Marker To Identify Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Serogroup O111 **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3450, 2003b.

GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R.T.S.; CERQUEIRA, A. M. F.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A.T. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Shiga Toxin-producing Strains Isolated from Children in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1085-1089, 2002a.

GUTH, B. E. C., SOUZA, R. L. ; VAZ, T. M. I. ; IRINO, K. Letter: First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil , **Emerg. Infect. Dis.** v. 8, 2002b. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/432551>> Acesso em :15 jul .2003.

GYLES , C. ; JOHNSON, R.; GAO, A.; ZIEBELL, K.; PIERARD, D.; ALEKSIC, S.; BOERLIN, P. Association of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin with Serotypes of Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, n.11, p. 4134-4141, 1998.

HARTL , D. L. ; DYKHUIZEN, D. E. , The Population Genetics of *Escherichia coli*. **Ann. Rev. Genet.**, v.18, p. 31-68, 1984.

HOFINGER, C.; KARCH, H.; SCHMIDT, H. Structure and function of plasmid pColD157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 24-29, 1998.

ISENBERG, H.D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**, Washington, ASM, v. 2, 1994, p.10.1.1-10.1.4.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z. V.F.; LARA, R. R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A. T.; GUTH, B.E.C. O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 4, p. 446-447, 2002.

JENKINS, C.; PERRY, N. T.; CHEASTY, T.;SHAW, D.J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G. J.; SMITH, H.R.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Distribution of the *saa* Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1775-1778, 2003.

JURGENS, D.; OZEL, M.; TAKAISI-KIKUNI, N. B. Production and Characterization of *Escherichia coli* Enterohemolysin and its Effects on the Structure of Erythrocyte Membranes. **Cell Biol. Intern.**, v. 26, n.2, p.175-186, 2002.

KADO, C.J.; LIU, S.T. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids, **J. Bacteriol.**, v.145, n. 3, p. 1365-1373, 1981.

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

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 34, p. 229-243, 1999a.

KARCH, H.; SCHMIDT, H.; BRUNDER, W. Plasmid-Encoded Determinants of *Escherichia coli* O157. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains**. Washington: ASM, 1998. p. 183-194.

KARCH, H.; SCHUBERT, S.; ZHANG, D.; ZHANG, W.; SCHMIDT, H.; OLSCHLAGER, T.; HACKER, J. A Genomic Island, Termed High-Pathogenicity Island, Is Present in Certain Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Clonal Lineages. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 11, p. 5994-6001, 1999b.

KARMALI, M. A. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* **Clin. Microbiol. Rev.** , v. 2, n. 1, p. 15-38, 1989.

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic Cases of Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Fecal Cytotoxin and Cytotoxin Producing *Escherichia coli* , **Lancet** . v. 1, n. 8325, p. 619-620 , 1983.

KEHL, S. C. Role of the laboratory in the diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 2711-2715, 2002.

KUNTZ, T. B.; KUNTZ, S. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. **Prim. Care Update Ob/Gyns.**, v. 6, p.192-196, 1999.

KHAN, A.; YAMASAKI, S.; SATO, T.; RAMAMURTHY, T.; PALA, A.; DATTA, S.; CHOIWDHURY, N.R.; DAS, S. C.; SIKDAR, A.; TSUKAMOTO, T.; BHATTACHARYA, S. K.; TAKEDA, Y.; NAIR, G. B. Prevalence and Genetic Profiling of Virulence Determinants of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Beef, and Humans, Calcutta, India. **Emerg. Infect. Dis.** , v. 8, n. 1, p. 54-62, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIN Jr, W.C. **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia, Lippincott, 1997.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli* , **Infect. Immun.**, n. 18, p. 775-779, 1977.

LECLERCQ, A.; LAMBERT, B.; PIERARD, D.; MAHILLON, J. Particular Biochemical Profiles for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates on the ID 32E System. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 1161-1164, 2001.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, 10 ed , New Jersey: Prentice Hall, 2003 , 1104 p.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3 ed , Lippincott Williams&Wilkins, 2000.

MAIDHOF, H.; GUERRA, B.; ABBAS, S.; ELSHEIKHA, H. M., WHITTAM, T. S.; BEUTIN, L. A Multiresistant Clone of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O118:H16 Is Spread in Cattle and Humans over Different European Countries. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 68, n. 12, p. 5834-5842, 2002.

MARTÍNEZ, J. L; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p. 647-679, 2002.

MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B. N. Rethinking Tuberculosis Epidemiology: the Utility of Molecular Methods. **ASM News**, v. 69, n. 2, 2003.

MAYER, L. W. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, n. 2, p. 228-243, 1988.

MEYERS, J. A.; SANCHES, D.; ELWELL, L. P.; FALKOW, S. Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification of Plasmid Deoxyribonucleic Acid **J. Bacteriol.** , v. 127, n. 3, p. 1529-1537, 1976.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. P. Virulence Genes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Food, Animals and Humans. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 45, n. 3, p.229-235, 1998.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNEMBERG, M. S.; KAPER, J. B. A Genetic Locus of Enterocyte Effacement Conserved Among Diverse Enterobacterial Pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MERCADO, E. C.; GIOFFRE, A.; RODRIGUEZ, S. M.; CATALDI, A.; IRINO, K.; ELIZONDO, A. M.; CIPOLLA, A. L.; ROMANO, M. I.; MALENA, R.; MENDEZ, M. A. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina. **J. Vet. Med. Series B**, v. 51, n. 2, p. 82-88, 2004.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Isolated from Healthy Dairy Cattle in Southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 93, n. 3, p.179-183, 2003.

NATARO, J. P. ; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 142-201. 1998.

NCCLS. **Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Test : Approved Standard-Eighth Edition**. v. 23, n. 1, 2003

- NOLTE, F. S.; CONLIN, C. A.; ROISIN, A. J. M.; REDMOND, S. R. Plasmids as Epidemiological Markers in Nosocomial Legionnaire's Disease. **J. Infect. Dis.**, v.149, n. 2, p. 251-252, 1984.
- O'BRIEN, A. D; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* Type 1-Like Cytotoxin by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 146, n. 6, p. 763-769, 1982.
- O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. Purification and Characterization of a *Shigella* disenteriae 1-Like Toxin produced by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 40, n. 2, p. 675-683, 1983.
- O'BRIEN, A. D; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W.; FORMAL, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 Strains Associated with Haemorrhagic Colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like Cytotoxin. **Lancet**, v. 1, p. 702, 1983.
- PARK, C. H.; KIM, H. J.; HIXON, D. L. Importance of Testing Stool Specimens for Shiga Toxins, **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 9, p. 3542-3543, 2002.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* Enterohemorrhagic *E.coli hlyA*, *rfb*_{O11} and *rfb*_{O157} . **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998a.
- PATON, A. W., RATCLIFF, R. M.; DOYLE, R. M.; SEYMOUR MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANSER, J. A.; PATON, J. C. Molecular Microbiological Investigation of an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Caused by dry Fermented Sausage Contaminated with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1622-1627, 1996.
- PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That are Virulent for Humans. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6999-7009, 2001.
- PATON, J. C.; PATON A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections , **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3 , p. 450-479, 1998b.
- PIGATTO, C. P. **Isolamento e Frequência de *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga em Bovinos no Estado do Paraná.** Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Paraná.
- PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic Molecular Microbiology – Principles and applications**, Washington: ASM, 1993, 641 p.
- PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of New Verotoxin Type 2 Variant B-subunit Genes in Human and

- Animal *Escherichia coli* isolates, **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n. 11, p. 3317-3322, 1998.
- RADU, S.; LING, O. W.; RUSUL, G.; KARIM, M. A. K.; NISHIBUCHI, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR and their Characterization by Plasmid Profiling, Antimicrobial Resistance, RAPD and PFGE Analyses. **J. Microbiol. Methods**, v. 46, n. 2, p.131-139, 2001.
- RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, R. D.; MACGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L.. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype, **N. Engl. J. Med.**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.
- ROCHELLE, P. A.; FRY, J. C.; DAY, M. J.; BALE, M. J. An Accurate Method for Estimating Sizes of Small and Large Plasmids and DNA Fragments by Gel Electrophoresis **J. Gen. Microbiol.** , v. 132, p. 53-59, 1985.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis. A molecular approach.** Washington :ASM Press, 1994, 418 p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2 ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1659 p.
- SCHABERG, D. R.; TOMPKINS, L. S.; FALKOW, S. Use of Agarose Gel Electrophoresis Plasmid Deoxiribonucleic Acid to Fingerprints Gram-Negative Bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, n. 6, p.1105-1108, 1981.
- SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL933. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 3, p. 1055-1061, 1995.
- SCHMIDT, H; GEITZ, C.; TARR, P. I.; FROSCH, M.; KARCH, H. Non-0157:H7 Pathogenic Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Phenotypic and Genetic Profiling of Virulence Traits and Evidence of Clonality. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p.115-123, 1999.
- SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic Phenotypes and Genotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111 Strains from Patients with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, n. 10, p. 2364-2367, 1996.
- SCHMIDT, H.; KARCH, H.; BEUTIN, L. The Large-Sized Plasmid of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains Encode Hemolysins which are Presumably Members of the *E. coli* Alpha-Hemolysin Family. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, n. 2, p. 189-196, 1994.
- SCHMIDT, H.; KERNBACH, C.; KARCH, H. Analysis of the EHEC *hly* and its Location in the Physical Map of the Large Plasmid of Enterohaemorrhagic O157:H7. **Microbiology** , v.142, p. 907-914, 1996.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. A. New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 3, p. 1205–1208, 2000.

SCHROEDER, C. M.; MENG, J.; ZHAO, S.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, C.; McDERMOTT, P. F.; WAGNER, D. D.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from Animals and Humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 12, p. 1409-1414, 2002.

SILVA, L. R. Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em Bovinos Abatidos em Matadouro Frigorífico de Curitiba - Paraná. Curitiba, 2002, Dissertação de Mestrado, Depto. de Medicina. Veterinária Universidade Federal do Paraná.

SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P.J. Species Differences in Plasmid Carriage in the Enterobacteriaceae, **Plasmid**, v. 49, p. 79-85, 2003

SONNTAG, A K.; PRAGER, R.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, B.; FRUTH, A; TSCHAPE, H.; KARCH, H. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 954-962, 2004.

STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C. Molecular Characterization of Cloned Avirulence Genes from Race 0 and Race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **J. Bacteriol.** v. 169, n.12, p. 5789-5794, 1987.

TARR, P. I.; NEILL, M. A. Perspective: The Problem of Non-O157:H7 Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v.174, n. 5, p.1136-1139, 1996.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections : a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.18, n. 6, p.426-439, 1997.

TSCHAPE, H.; FRUTH. A Enterohemorrhagic *Escherichia coli* . **Contributions to Microbiology** , v.8. p.1-11, Basel: Karger, 2001..

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A . M . F .; DIAS, A. M. G.; GOMES, T. A.. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n. 2, p. 903–905, 2004.

VETORATTO, M. P.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Properties of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Isolates from Sheep in the State of São Paulo, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 95, p. 103-109, 2003.

WACHSMUNT, I. K.; KIEHLBAUCH, J. A.; BOPP, C. A.; CAMERON, D. N.; STROCKBINE, N. A.; WELLS, J. G.; BLAKE, P. A. The Use of Plasmid Profiles and

Nucleic Acid Probes in Epidemiologic Investigations of Foodborne Diarrheal Diseases **Intl. J. F. Microbiol.**, v. 12 , p. 77-90, 1991

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M.H.; AMMON, A.; TSCHÄPE, H. Strong Association Between Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Virulence Genes *stx*₂ and *eae* as Possible Explanation for Predominance of Serogroup O157 in Patients with Haemolytic Uraemic Syndrome. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 726-730, 2003.

WILLSHAW, G. A.; SMITH, H. R.; ANDERSON, E. S. Application of Agarose Gel Electrophoresis to the Characterization of Plasmid DNA in Drug-Resistant Enterobacteria. **J. Gen. Microbiol.** v. 114, n. 1, p. 15-25, 1979.

WHO/CSR/APH/98.8 Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany 23-26 June 1998. **World Health Organization** p.1-33, 1998.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. **J. Clin. Microbiol.** v. 40 , n. 4, p. 1441-1446, 2002.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; LIESEGANG, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, H.; BITZAN, M.; KARCH, H. Molecular Characteristics and Epidemiological Significance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2134-2140, 2000.

ANEXO 1

REAGENTES, MEIOS DE CULTURA, DISCOS DE AÇÚCARES E ANTIBIÓTICOS	PROCEDÊNCIA
ADONITOL ARABINOSE DULCITOL INOSITOL MALTOSE LACTOSE SACAROSE SORBITOL RAFINOSE RHAMNOSE ÁCIDO NALIDÍXICO 30 µg AMPICILINA 10 µg CEFALOTINA 30 µg CIPROFLOXACINA 5 µg CLORANFENICOL 30µg ESTREPTOMICINA 10µg GENTAMICINA 10 µg IMIPENEM 10 µg NITROFURANTOINA 300 µg SULFAMETOXAZOL 23,75 µg + TRIMETOPRIMA 1,25 µg TETRACICLINA 30 µg	LABORCLIN
CELOBIOSE MELIBIOSE SALICIN TREALOSE XILOSE	CEFAR
AGAROSE	GIBCO BRL
D-GLUCOSE URÉIA	REAGEN
FENOL:CLOROFORMIO:ALCOOL ISOAMÍLICO (25:24:1)	INVITROGEN
GLICERINA ESTÉRIL REAGENTE DE KOVACS CLORETO FÉRRICO ALFA NAFTOL NAOH 40 %	NEWPROV
MIL MEDIUM SIMONS CITRATE AGAR PURPLE BROTH BASE	DIFCO
ÁCIDO BÓRICO MR-VP L-ARGININE L-ORNITINE ETANOL ABSOLUTO	MERCK
MUELLER HINTON AGAR KLIGER IRON AGAR PHENILALANINE AGAR	OXOID
SIM	BIOBRÁS
TRIS	CARLO ERBA

REAGENTES, MEIOS DE CULTURA, DISCOS DE AÇÚCARES E ANTIBIÓTICOS	PROCEDÊNCIA
EDTA	
TRYPTIC SOY BROTH TRYPTIC SOY AGAR BLOOD AGAR BASE	BBL
URÉIA AGAR BASE	MAST DIAGNOSTIC
SDS	ALLIED SIGNAL RIEDEL- DE HÄEN