

CAROLINE PETERS PIGATTO

**ISOLAMENTO E FREQUÊNCIA DE *Escherichia coli*
PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) EM CULTURA
FECAL DE BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Warth

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cyntia Maria
Telles Fadel Picheth

CURITIBA

2004



PARECER

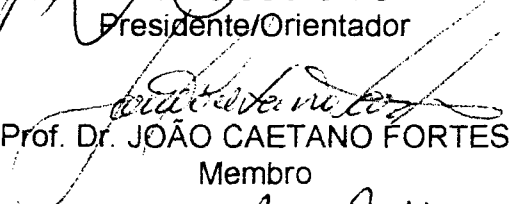
A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **CAROLINE PETERS PIGATTO** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Dissertação, intitulada **“ISOLAMENTO E FREQUÊNCIA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) EM CULTURA FECAL DE BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou a candidata aprovada concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 26 de março de 2004.


Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO GHIGNATTI WARTH
Presidente/Orientador


Prof. Dr. JOÃO CAETANO FORTES
Membro


Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH
Membro

AGRADECIMENTOS

“O rio atinge seus objetivos, porque aprendeu a contornar obstáculos” (Quo Vadis)

O mestrado foi uma longa caminhada com muitos desafios. Chegar ao fim desta jornada não seria possível sem a ajuda e cooperação de muitas pessoas. Tenho muito o que agradecer:

- A Santa Teresinha que sempre ilumina o meu caminho.
- A minha querida mãe (Carmen), pai (Ernani) e irmã Mariane pelo incondicional apoio.
- Ao meu namorado Andrigo pelo apoio e estímulo.
- A Profa Cyntia Maria Telles Fadel Picheth pelo seu exemplo, apoio e incentivo dando-me a oportunidade do exercício de aprender sempre, minha especial gratidão. Que Deus ilumine o seu caminho.
- A Sônia Farah (farmacêutica bioquímica do LACEN), pela colaboração inestimável nos experimentos.
- Ao meu orientador Prof José Francisco Warth pelos seus ensinamentos.
- Ao Prof. Lineu Roberto da Silva pelo seu incentivo e ajuda no início das pesquisas.
- A Dra Kinue Irino (Instituto Adolfo Lutz) pela sua colaboração na execução do ensaio de citotoxicidade em células Vero.
- A Fabiana De Toni pelo companheirismo e ajuda na prática laboratorial.
- A Maria Constanza Rodriguez pelo auxílio na versão em inglês do resumo.
- A todos que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada !

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS <i>Escherichia coli</i> PATOGÊNICAS.....	12
3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DA <i>Escherichia coli</i>	13
3.3 ESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE <i>Escherichia coli</i>	16
3.3.1 Antígenos de Superfície O-K	17
3.3.2 Antígenos Flagelares	18
3.3.3 Antígenos de Aderência	18
3.4 <i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC).....	19
3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	20
3.5.1 Intimina	20
3.5.2 Toxina - Shiga	21
3.5.3 Presença de Plasmídeo de Virulência.....	22
3.5.3.1 Enterohemolisina (gene <i>hlyA</i>).....	22
3.5.3.2 Gene <i>Saa</i>	22
3.5.4 Ácido resistência	23
3.6 FONTES DE INFECÇÃO HUMANA E FORMAS DE TRANSMISSÃO	23
3.6.1 Reservatório	23
3.6.2 Alimentos	26
3.6.3 Contato pessoa-pessoa.....	28
3.7 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR STEC	28
3.8 MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR CEPAS STEC	31
3.9 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CEPAS STEC	32
3.9.1 Meios de Enriquecimento Seletivo.....	32
3.9.1.1 Caldo Trypticase Soy Broth (TSB) com Novobiocina	32
3.9.1.2 Separação Imunomagnética.....	33
3.9.2 Ágar MacConkey Sorbitol (SMAC).....	33
3.9.3 Ensaio de Citotoxicidade em Células Vero	34
3.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase	35

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 BASES FÍSICAS LABORATORIAIS	36
4.2 CÁLCULO DA AMOSTRAGEM MÍNIMA	36
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS FECAIS BOVINAS POR AMOSTRAGEM.....	37
4.4 TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	38
4.5.1 Isolamento em Ágar MacConkey sorbitol (SMAC).....	38
4.5.2 Triagem bioquímica para <i>Escherichia coli</i>	38
4.5.3 Sorologia para o antígeno somático O157.....	39
4.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULA VERO.....	41
4.6.1 Extração da toxina Shiga a partir das colônias isoladas.	41
4.6.2 Ensaio de citotoxicidade.....	41
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	42
4.7.1 Extração do DNA.....	42
4.7.2 Iniciadores Utilizados.....	42
4.7.3 Protocolo de Amplificação.....	43
4.8 CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DE PCR..	44
4.9 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE CEPAS STEC EM FUNÇÃO DAS TEMPERATURAS MÉDIAS AMBIENTAIS.	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS FECAIS	46
5.2 TRIAGEM DAS AMOSTRAS PARA <i>Escherichia coli</i> STEC O157:H7 EM SMAC	46
5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO	47
5.4 DETECÇÃO DOS GENES <i>stx</i>	49
5.5 COMPARAÇÃO ENTRE O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E A PCR PARA GENES <i>stx</i>	51
5.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR	52
5.7 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE STEC NOS MESES DE TEMPERATURA MÉDIA DE 13°C E 21°C.	53
5.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE ISOLAMENTO DAS CEPAS STEC NOS REBANHOS ESTUDADOS.	55

6 DISCUSSÃO.....	57
6.1 Pesquisa de STEC O157:H7 em Ágar MacConkey sorbitol (SMAC).....	57
6.2 Pesquisa de cepas de <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina Shiga (STEC)	58
6.3 Detecção de genes <i>stx</i> por PCR.....	59
6.4 ESTUDO COMPARATIVO DA PCR EM RELAÇÃO AO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.....	60
6.5 FREQUÊNCIA DE CEPAS STEC NOS MESES DO ANO COM TEMPERATURA MÉDIA DE 21°C E 13°C	61
6.6 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE CEPAS STEC EM FEZES DE ANIMAIS JOVENS E ADULTOS.	61
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....	75
ANEXO 2 – INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS.....	80
ANEXO 3 – PREPARAÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO PARA A REALIZAÇÃO DE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.....	82
ANEXO 4- BIOLOGIA MOLECULAR.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	lesão "attaching and effacing"
eae	gene codificador da intimina
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênci
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
Gb ₃	Receptores Globotriosil ceramida
<i>hlyA</i>	gene codificador da hemolisina
kb	kilobase
LEE	"locus of enterocyte effacement"
LPS	lipopolissacarídeo
pb	pares de base
PCR	"polimerase chain reaction"
SHU (HUS)	Síndrome Hemolítica Urêmica
SLT	"Shiga-like toxin"
STEC	"Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> "
Stx	toxina Shiga
Stx 1	toxina Shiga 1
Stx 2	toxina Shiga 2
<i>stx</i>	gene codificador de STX
<i>stx 1</i>	gene codificador de STX 1
<i>stx 2</i>	gene codificador de STX 2
<i>tir</i>	gene codificador da proteína TIR
TIR	"translocated intimin receptor"
PTT	púrpura trombocitopênica trombótica
UFC	unidade formadora de colônia
VT	verotoxina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>Escherichia coli</i>	14
TABELA 2 – REAÇÕES DAS BACTÉRIAS COLIFORMES	15
TABELA 3 – DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Escherichia</i>	16
TABELA 4 - INFORMAÇÕES DOS INICIADORES UTILIZADOS NA PCR.....	43
TABELA 5- PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO.....	43
TABELA 6- CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DE PCR	44
TABELA 7 - FREQUÊNCIA DE <i>E. coli</i> STEC EM ANIMAIS ADULTOS E BEZERROS PELO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO EM DEZ DE 2002 A NOV DE 2003 NO ESTADO DO PARANÁ	48
TABELA 8 - FREQUÊNCIA DE <i>E. coli</i> STEC EM ANIMAIS ADULTOS E BEZERROS POR PCR EM DEZ DE 2002 A NOV DE 2003 NO ESTADO DO PARANÁ.....	51
TABELA 9 - PROCEDÊNCIA REGIONAL DOS ANIMAIS E FREQUÊNCIA DE CEPAS STEC	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ORGANOGRAMA DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 EM AMOSTRAS FECAIS.....	40
FIGURA 2 – <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EM ÁGAR MACCONKEY SORBITOL.....	47
FIGURA 3 – FREQUÊNCIA MENSAL DE <i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA UTILIZANDO O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2002 A NOVEMBRO DE 2003.....	48
FIGURA 4- PRODUTOS DE PCR PARA GENES <i>stx</i>	49
FIGURA 5 – FREQUÊNCIA MENSAL DE CEPAS STEC POR PCR NO PERÍODO DE DEZ DE 2002 A NOVEMBRO DE 2003 UTILIZANDO O INICIADOR DE LINN MODIFICADO.....	50
FIGURA 6 - FREQUÊNCIA MENSAL DE <i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA COMPARANDO O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E A PCR NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2002 A NOVEMBRO DE 2003.....	52
FIGURA 7 – FREQUÊNCIA DE CEPAS STEC PELO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO NOS MESES COM TEMPERATURA MÉDIA DE 21°C (DEZ/2002 A MAIO/2003 E NOV/2003) E MESES COM TEMPERATURA MÉDIA DE 13°C (JUN A SET DE 2003).	54
FIGURA 8 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO OS MUNICÍPIOS ANALISADOS QUANTO A PRESENÇA DE STEC NO REBANHO BOVINO.	56

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a frequência de *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC) no conteúdo entérico de bovinos no estado do Paraná. Foram empregadas 3 diferentes metodologias: cultura em Ágar MacConkey sorbitol, detecção da citotoxicidade em células Vero e a PCR para detecção de genes que codificam a toxina Shiga. Para tanto foram analisadas no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, 193 amostras de swab retal de bovinos. Colônias isoladas com características de *Escherichia coli*, foram analisadas por meio destas metodologias. No teste de citotoxicidade em células Vero 66 (34%) das amostras apresentaram positividade ao passo que na PCR 81 (42%) das amostras apresentaram a banda de amplificação do tamanho esperado para o gene *stx*. Nenhuma cepa aglutinou frente ao antisoro O157. Foi demonstrada a elevada ocorrência de cepas STEC não-O157 na população bovina estudada sugerindo potencial risco zoonótico. A positividade apresentada no método de PCR foi maior em comparação ao ensaio da citotoxicidade em células Vero.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from bovine enteric content collected in Parana State, Brazil. Three different methods were applied: sorbitol-MacConkey Ágar (SMAC), citotoxicity on VERO cells and gene detection by polymerase chain reaction (PCR). In this study, 193 rectal swab samples were investigated from December 2002 to November 2003. Isolated colonies with *E. coli* features, had O157 antiserum negative agglutination. The cytotoxicity test showed 66 (34%) positive samples and PCR showed the expected size for gene *stx* amplification band in 81(42%) samples. A high occurrence of non-O157 STEC strains was found in the studied bovine population suggesting a potential zoonotic danger. The PCR positivity was higher than the citotoxicity on Vero cells.

1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram Negativo da família *Enterobacteriaceae*. Faz parte da microbiota intestinal dos mamíferos como comensal, mas algumas estirpes estão associadas a patologias intestinais e extraintestinais no homem e animais (DE GRAAF, 1990).

As linhagens de *E. coli* patogênicas causadoras de infecções entéricas no homem e nos animais envolvem pelo menos 5 categorias: cepas enteropatogênicas (EPEC), cepas enteroinvasoras (EIEC), cepas enterotoxigênicas (ETEC), cepas enteroagregativas (EAEC) e cepas produtoras de toxina Shiga (STEC). Destaca-se entre estas categorias, as cepas classificadas como STEC devido ao seu potencial zoonótico emergente.

As cepas STEC também são denominadas como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) ou Shiga-like toxin *Escherichia coli* (NATARO e KAPER, 1998).

As *Escherichia coli* Shigatoxigênicas (STEC) foram confirmadas como patógenos humanos em 1983 quando RILEY *et al.*, (1983) isolaram de um surto de doença gastrointestinal ocorrido nos Estados Unidos, um sorotipo até então raro de *Escherichia coli* classificado como O157:H7.

Desde então o número de infecções causadas por cepas STEC vêm crescendo em todo o mundo (WHO, 1998). As cepas STEC são reconhecidas como um importante grupo de patógenos emergentes e tornaram-se um grande desafio à saúde pública, pois possuem um alto grau de infectividade para os humanos, e mesmo em baixo número no alimento ingerido (10 UFC) são capazes de provocar infecção entérica (BELL, 2002). O aumento gradativo da ocorrência de surtos alimentares em todo o mundo tem mostrado a importância da obtenção de informações sobre a epidemiologia e identificação dos principais reservatórios da mesma (WHO, 1998).

O principal reservatório deste microrganismo é o intestino de ruminantes, principalmente de bovinos, ressaltando sua presença no ambiente onde os animais são mantidos (COBBOLD *et al.*, 2002). Embora se enfatize o estudo da prevalência do sorotipo O157:H7, mais de 100 sorotipos diferentes de cepas de STEC já foram associados com o desenvolvimento de infecções entéricas. Por esta razão, emprega-se freqüentemente o termo STEC não-O157, para se referir aos demais sorogrupos de *Escherichia coli* produtores de toxina Shiga (WHO, 1998).

Inúmeros sorotipos de cepas de STEC têm sido isolados de reservatórios animais e de alimentos de origem animal, sendo que muitos estão associados com a infecção no homem (GYLES *et al.*, 1994). Métodos convencionais de isolamento de *Escherichia coli* mostraram-se ineficazes para a identificação de cepas classificadas como STEC. Dificuldades são ocasionadas devido ao baixo número de unidades formadoras de colônia por grama de fezes, profusa presença de microbiota competitiva considerada normal, bem como aos inibidores naturais de crescimento bacteriano presentes no intestino que interferem na multiplicação do microrganismo em questão. Em alguns países, mais de 90% das doenças causadas por cepas STEC são ocasionadas por sorotipos distintos do O157:H7 reconhecendo-se a importância de métodos específicos de detecção e caracterização destas estirpes igualmente toxigênicas (GIOFFRÉ *et al.*, 2002).

No Brasil são poucas as informações disponíveis sobre cepas STEC, porém sabe-se que infecções em humanos ocorrem com mais freqüência em crianças e geralmente resultam em quadros de diarreia (CANTARELLI *et al.*, 2000; GUTH *et al.*, 2002).

SILVA (2002) isolou uma cepa de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos de corte no estado do Paraná, em estudo considerado pioneiro, mas aparentemente há predominância de cepas STEC não-O157 no rebanho bovino brasileiro (FARAH *et al.*, 2003; IRINO *et al.*, 2003).

Apesar desses dados mais estudos são necessários para que se possa conhecer a distribuição das cepas de STEC presentes no rebanho bovino do estado do Paraná, visando estratégias de prevenção e controle da infecção.

2 OBJETIVOS

- Determinar a presença de *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 no conteúdo entérico de bovinos do estado do Paraná.
- Determinar a presença de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga no conteúdo entérico dos mesmos animais.
- Isolar cepas STEC do conteúdo entérico de bovinos do estado do Paraná.
- Comparar as metodologias utilizadas.
- Avaliar as possíveis períodos do ano de maior frequência da *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em fezes bovinas no estado do Paraná.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1885, Theodor Von Escherich, pediatra alemão, descreveu organismos microscópicos isolados de fezes de neonatos humanos, que denominou de *Bacterium coli commune* hoje conhecidas e classificadas como *Escherichia coli* (ORSKOV e ORSKOV, 1985). A espécie encontra-se presente no conteúdo intestinal de humanos e animais sem causar qualquer doença (BETTELHEIM, 1996). Diferentes cepas desta espécie vivem harmoniosamente no intestino humano. São enquadradas como bactérias Gram Negativas consideradas indispensáveis ao organismo humano, sintetizando as vitaminas B e K. Porém, existem algumas estirpes patogênicas sobretudo em crianças e idosos.

3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS *Escherichia coli* PATOGÊNICAS.

As cepas patogênicas de *Escherichia coli* são classificadas como intestinais e extraintestinais. As extraintestinais são denominadas, segundo seu local de isolamento (ORSKOV e ORSKOV, 1985; LIOR, 1994).

As cepas extraintestinais são classificadas pelos autores em:

- UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica): responsáveis por infecções do aparelho urinário após adesão no epitélio (humano e cães).
- SEPEC (*Escherichia coli* septicêmica): responsáveis por sepsis (colissepticemia) em humanos, leitões e bezerros.
- MENECA (*Escherichia coli* causadoras de meningite): responsáveis por meningites humanas em recém-nascidos.

As características empregadas na classificação das cepas de *Escherichia coli* causadoras de infecções entéricas incluem produção de toxina, capacidade de invasão, capacidade de adesão nas células do hospedeiro, padrões de adesão da bactéria à célula do hospedeiro, efeitos de adesão à célula hospedeira, entre outras (NATARO e KAPER, 1998). As cepas intestinais são classificadas pelos autores em:

- ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica): cepas possuidoras de fímbrias K88, K99 e outras; a produção destes fatores de colonização está

correlacionada com a produção de enterotoxinas causadoras da maioria das colibaciloses neonatais em humanos e animais.

- EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica): cepas possuidoras de fatores de virulência responsáveis pela colonização, mas não produtoras de enterotoxinas ou verotoxinas; causadoras de diarreia em humanos e animais.
- EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva): cepas com capacidade de adesão às células do intestino delgado distal, invasoras dos enterócitos e camadas mais profundas da mucosa intestinal, alcançando o sistema linfático onde ocorre multiplicação; algumas células bacterianas morrem liberando endotoxinas. Fatores de virulência tais como cápsulas, adesinas, sideróforos e alfa-hemolisinas são importantes para estas cepas invasivas as quais são responsáveis por colisepticemia.
- EaggEC (*Escherichia coli* enteroagregativa): cepas possuidoras de fímbrias e produtoras de uma enterotoxina ST-like (EAST1); causadoras de diarreia em humanos.
- *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), envolvidas na síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica em humanos.

3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DA *Escherichia coli*

Como membro típico da família *Enterobacteriaceae*, as *Escherichia coli* utilizam a glicose fermentativamente, são oxidase negativas e reduzem nitratos a nitritos. São bactérias anaeróbicas facultativas com uma temperatura ótima de crescimento de 37°C. As colônias podem ser lisas, convexas, cinzas e com bordas regulares ou rugosas (KONEMANN *et al.*, 2001).

Embora sejam citadas inúmeras reações bioquímicas utilizadas na identificação e na triagem desta espécie, a *Escherichia coli* pode ser isolada e caracterizada utilizando poucos meios de cultura. Os meios comumente empregados para o isolamento a partir de fezes e/ou conteúdo intestinal são o Ágar MacConkey e o Ágar sangue de carneiro (QUINN *et al.*, 1994). A TABELA 1 mostra uma série de reações bioquímicas utilizada na identificação da *Escherichia coli*.

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

CARACTERÍSTICA	RESULTADO
Produção de Indol	+
Vermelho de Metila	+
Voges-Proskauer	-
Citrato de Simons	-
Sulfito de Hidrogênio (TSI)	-
Urease	-
Fenilalanina deaminase	-
Lisina descarboxilase	(+)
Arginina diidrolase	(-)
Motilidade	(+)
Liquefação da gelatina a 22°C	(-)
Crescimento em KCN	(-)
Utilização do malonato	(-)
D-glucose (produção de ácido)	+
D-glucose (produção de gás)	+
Lactose	+
Sacarose	d
D-manitol	+
Dulcitol	d
Salicina	d
D-adonitol	-
Myi-inositol	-
D-sorbitol	+
L-arabinose	+
Rafinose	d
L-ramnose	(+)
Maltose	+
D-xylose	+
Trealose	+
Celobiose	-
Alfa-metil-D-glicosideo	-
Hidrólise da esculina	d
Melibiose	(+)
D-arabinol	-
Mucato	+
Lipase, corn oil	-
Deoxiribonuclease a 25°C	-
NO ₃ ⁻ » NO ₂ ⁻	+
Oxidase	-
ONPG	+
Pigmento amarelo	-
D-manose	+

Fonte: Manual Bergey (1984)

+, >90% das cepas são positivas; (+), 76/89% positivas; d, 26/75% positivas; (-), 11/25% positivas; -, 0/10% positivas.

A diferenciação entre os gêneros fermentadores da lactose da família *Enterobacteriaceae* (coliformes), além da diferenciação de espécie dentro do gênero *Escherichia* é de fundamental importância na identificação bacteriana (KONEMANN *et al.*, 2001). A TABELA 2 contém as reações de diferenciação de coliformes.

TABELA 2 – REAÇÕES DAS BACTÉRIAS COLIFORMES

MICROORGANISMO	INDOL	VERMELHO DE METILA	VOGES-PROSKAUER	CITRATO
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	v	+	-	v
<i>Citrobacter koseri</i>	+	+	-	+
<i>Enterobacter spp.</i>	-	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	v	+	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	+	-	v

Fonte: KONEMANN *et al.*, 2001

+, 90% das cepas são positivas; -, 90% das cepas são negativas; v, variável.

A TABELA 3 contém as reações de diferenciação do gênero *Escherichia* que atualmente possui cinco diferentes espécies.

TABELA 3 – DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Escherichia*

PROVAS BIOQUÍMICAS	<i>E. coli</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. blattae</i>	<i>E. vulneris</i>
Indol	+	+	+	-	-
Vermelho de metila	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	v (17)	v(50)	-
Lisina	+	-	+	+	v(85)
descarboxilase					
Arginina diidrolase	v (17)	-	-	-	v(30)
Ornitina	v (65)	+	+	+	-
descarboxilase					
ONPG	+	+	v(83)	-	+
Lactose	+	v (45)	-	-	v(15)
Sorbitol	+ ⁺	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	+
Adonitol	-	-	+	-	-
Celobiose	-	+	+	-	+
Pigmento amarelo	-	+	-	-	v(50)

Fonte: KONEMANN *et al.*, 2001

+, >90% de cepas positivas; -, >90% de cepas negativas; v, 11-89% de cepas positivas. ⁺ As cepas de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O157:H7 são sorbitol-negativas.

No entanto na rotina laboratorial cujo objetivo seja a identificação bioquímica das cepas de *Escherichia coli* do sorotipo O157:H7, são realizadas provas bioquímicas fundamentais como sorbitol, glicose, lisina e celobiose.

3.3 ESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *Escherichia coli*

Sob a designação *Escherichia coli* compreende grupo de bactérias que possuem reações bioquímicas similares, mas podem ser diferenciadas em sorotipos de acordo com sua composição antigênica (KONEMANN *et al.*, 2001).

A classificação sorológica das cepas de *Escherichia coli* é baseada na identificação de seus quatro antígenos de superfície: O (antígeno somático), K (antígeno capsular), H (antígeno flagelar) e F (antígeno fimbrial) (ORSKOV *et al.*, 1985). A determinação do antígeno "O" define o sorogrupo. O antígeno "H" define o sorotipo ou sorovar (VARMAM, 1991)

3.3.1 Antígenos de Superfície O-K

A especificidade sorológica dos antígenos O é baseada numa estrutura complexa da cadeia polissacarídica. A membrana externa dos organismos Gram negativos de constituição lipopolissacarídica (LPS) é composta por três regiões: lipídeo A, cerne e antígeno (O). O lipídeo A parece ser o principal componente responsável pelas manifestações da atividade endotóxica (FORSYTHE, 2002).

Os diferentes sorogrupos de *Escherichia coli* são identificados por meio da presença de antígenos de natureza lipopolissacarídica (O) e polissacarídica (K), localizados na parede bacteriana. Vários grupos são identificados e tipificados por diferentes técnicas sorológicas, recebendo designação numérica (O26, O111, O157,...) (ORSKOV *et al.*, 1985). Estes antígenos (O) são termoestáveis, ou seja, não são inativados em temperaturas de 100°C ou 121°C. A produção de antisoro é realizada em coelhos inoculados com suspensões de antígenos aquecidos (100°C ou 121°C) (SOJKA, 1971). Algumas cepas de *Escherichia coli* sofrem variações da forma lisa para a rugosa devido a mutações em genes responsáveis pela síntese da cadeia polissacarídica, perdendo a sua especificidade antigênica. Estas cepas autoaglutinam em solução salina não podendo ser sorotipadas (LIOR, 1994).

Embora a função dos antígenos somáticos não esteja completamente determinada algumas cepas de *Escherichia coli*, que possuem determinados grupos O, apresentariam vantagens no carreamento de material genético, relacionado à codificação de fatores de patogenicidade, incluindo a produção de toxinas (EVANS *et al.*, 1977).

Durante as investigações das características sorológicas de *E. coli*, KAUFMANN (1944) verificou que muitas bactérias vivas não aglutinavam com o antisoro O correspondente. A inibição da aglutinabilidade poderia ser resolvida ao aquecer a suspensão bacteriana. Em 1944, KAUFFMANN (1944) introduziu o termo K, derivado da palavra germânica “*kapsel*” (cápsula) para o antígeno responsável pela inaglutibilidade das cepas. Os antígenos K são polissacarídeos antigenicamente diferentes do antígeno somático (O) encontrando-se ainda mais externamente a eles (JANN e JANN, 1977).

3.3.2 Antígenos Flagelares

A motilidade de cepas de *Escherichia coli* deve-se a presença de flagelos de constituição protéica e estes determinam a especificidade do antígeno termolábil H. O conteúdo de aminoácidos e a ordem na qual eles ocorrem diferenciam sorologicamente as cepas. Algumas estirpes obtidas no isolamento primário podem mostrar uma menor motilidade, tornando-as inadequadas para a determinação sorológica do antígeno H devido a pouca quantidade de flagelo. Neste caso, as cepas devem ser passadas uma ou mais vezes em meio semi-sólido até que a motilidade seja estimulada e bem desenvolvida. A maioria dos antígenos H são específicos e mostram pouca ou nenhuma reatividade cruzada (EWING, 1986).

3.3.3 Antígenos de Aderência

ORSKOV *et al.*, (1981) descreveram a presença de um antígeno de superfície termolábil, denominado K88, encontrado em cepas de *Escherichia coli* isoladas de casos do edema e diarreia em suínos.

Importante etapa na colonização intestinal por cepas comensais ou patogênicas de *E. coli* é a ligação da bactéria a receptores localizados na mucosa de células epiteliais (HACKER, 1992). Apêndices filamentosos não flagelares de constituição protéica são as estruturas de superfície responsáveis por esta aderência. Os termos fímbria, fator de colonização e adesina são usados como sinônimos, mas de acordo com a microscopia eletrônica, as fímbrias são reveladas como estruturas rígidas de 5 a 7 cm de diâmetro (ORSKOV e ORSKOV, 1985). O termo adesina é empregado para aquelas estruturas protéicas não filiformes ou apendiformes não fimbriais (DE GRAAF, 1990).

3.4 *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC).

Determinadas cepas de *Escherichia coli* desenvolveram grande habilidade em causar doença humana, devido aos diferentes fatores de virulência (ARMSTRONG *et al.*, 1996). Mundialmente estas *Escherichia coli* estão inclusas entre os “Patógenos Emergentes”, definidos pelo Center for Disease Control (CDC) como “microrganismos novos ou variantes microbianas que vêm produzindo enfermidade em humanos em ritmo crescente nos últimos anos, ou que ameaçam aumentar sua patogenicidade em futuro próximo”.

A patogenicidade das cepas de *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC) está associada com vários fatores de virulência, principalmente a produção de toxina entérica. A identificação da *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) ou Shiga-like toxin *Escherichia coli* como patógeno humano ocorreu em 1983, quando foi isolado pela primeira vez o sorotipo O157:H7 até então raro. Este organismo foi isolado na análise de surto de doença gastrointestinal ocorrido nos Estados Unidos e associado com a ingestão de hambúrguer mal cozido. Os acometidos apresentaram dores abdominais severas, diarreia aquosa inicial seguida de diarreia hemorrágica, com pouca ou nenhuma febre, quadro este denominado colite hemorrágica (RILEY *et al.*, 1983). Em alguns indivíduos este quadro evolui para Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) caracterizada por insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica (KARMALI *et al.*, 1983). Além da colite hemorrágica e da Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), a cepa STEC está associada à púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) caracterizada por hemólise, trombocitopenia, insuficiência renal, problemas neurológicos e febre (KEUSCH *et al.*, 1998). Atualmente o sorotipo O157:H7 é considerado dominante em muitas partes do mundo e historicamente é a estirpe comumente associadas com grandes surtos de intoxicação alimentar (PATON & PATON, 1998).

As cepas STEC são consideradas um grande desafio à microbiologia atual, por ser patogênica aos humanos, originar problemas agudos com graves seqüelas, especialmente a insuficiência renal. Além disso, faz-se presente naturalmente em fezes de ruminantes, especialmente bovinos, não provocando sinais clínicos aparentes e podendo estar também presente no solo (BELL, 2002).

3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

O ser humano possui algumas defesas inespecíficas contra a instalação de infecção intestinal, destacando-se a acidez gástrica, o muco, a motilidade intestinal, a microbiota normal competitiva e a imunidade intestinal (BORTOLINI, 1995).

A doença entérica é causada pela interação microrganismo – hospedeiro, com alteração da fisiologia gastrintestinal normal. Essas alterações podem ser provocadas pela presença de um ou mais fatores de virulência bacterianos considerados indispensáveis para que os enteropatógenos possam vencer as defesas do hospedeiro e produzir doença clínica (BORTOLINI, 1995).

A aderência às células da mucosa intestinal e a produção de toxina são os principais fatores de virulência bacterianos apresentados por esta cepa. Além desses, vários outros fatores tem sido descritos nas cepas STEC e associados com a gravidade da doença (GRIFFIN & TAUXE, 1991).

3.5.1 Intimina

Algumas cepas STEC são capazes de produzir uma proteína de adesão denominada intimina, codificada pelo gene *eae* (WIELER, 1996). A intimina torna estas estirpes de STEC capazes de aderir fortemente as células intestinais. Este processo provoca lesões que degeneram as bordas ciliadas das microvilosidades do intestino devido à deformação da actina das células do hospedeiro, desestruturando as microvilosidades e levando à formação de uma estrutura em pedestal na célula hospedeira sob a região onde a bactéria está aderida (NATARO e KAPER, 1998).

Os genes responsáveis pela produção de intimina, encontram-se numa região do cromossomo denominada ilha de patogenicidade LEE (*locus for enterocyte effacement*). O locus LEE inclui genes que codificam um sistema de secreção tipo III envolvido na secreção extracelular de diversas proteínas (EspA, EspB, EspD), além do gene *eae* que capacita a célula bacteriana a aderir fortemente na célula hospedeira (ROSENSHINE *et al.*, 1996).

A capacidade de induzir a formação da lesão do tipo A/E foi primeiramente observada em cepas de *Escherichia coli* classificadas como EPEC. Posteriormente o

fenômeno foi observado em *E. coli* O157:H7 (STEC) e em cepas STEC de outros sorogrupos, como O26, O103 e O111 (KAPER *et al.*, 1998).

Embora a grande maioria das cepas de STEC em doença humana possuam o gene *eae*, muitas cepas não-O157 isoladas não apresentam este gene, indicando que existem fatores de aderência adicionais ainda desconhecidos (NATARO e KAPER, 1998).

3.5.2 Toxina - Shiga

A produção de toxina Shiga (Shiga-like toxin) constitui o principal fator de virulência das cepas STEC associado com colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (BOERLIN *et al.*, 1998).

A denominação toxina Shiga teve origem na similaridade bioquímica, biológica e genética com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1. Em *E. coli* a toxina Shiga está codificada no genoma de bacteriófagos (INFOR-NET DTA, 2002).

As Shigatoxinas produzidas pelas cepas de STEC são denominadas toxina Shiga 1 (Stx1) e toxina Shiga 2 (Stx2). As cepas STEC podem expressar somente Stx1, somente Stx2 ou produzir ambas as toxinas ou suas variantes (NATARO & KAPER, 1998). A toxina Shiga 1 possui a variante 1c (BÜRK *et al.*, 2003) e Shiga 2 possui as variantes 2c e 2d encontrados em isolados clínicos humanos, 2e encontrado em suínos (GIOFFRÉ, 2002), 2f isoladas de suínos e pombos (SCHMIDT, 2000; EKLUND, 2002) e 2g isoladas de bovinos (LEUNG *et al.*, 2003).

A toxina Stx1 difere em apenas um aminoácido da Stx produzida pela *S. dysenteriae*. A seqüência de aminoácidos do subgrupo Stx2 mostra apenas 58% de homologia com o subgrupo Stx/Stx1 (MELTON-CELSA e O'BRIEN, 1998). A gravidade da doença está diretamente relacionada com a presença da Stx 1 e Stx 2 ou ambas. A Stx 2 está relacionada com quadros mais graves (NATARO & KAPER, 1998). Estruturalmente estas toxinas pertencem ao grupo do tipo A/B, apresentando cinco unidades do tipo B que realizam a ligação com os receptores Gb₃ e uma unidade A que é a porção ativa. Após a ligação à célula entérica e posterior internalização toxina, a subunidade A remove um resíduo de adenina do RNA

ribossomal 28S, inibindo a síntese protéica. O receptor Gb₃ também está presente em células Vero e em outras linhagens celulares sensíveis à toxina, utilizados nos testes de citotoxicidade "in vitro", como também no tecido renal humano (GRIFFIN & TAUXE, 1991).

3.5.3 Presença de Plasmídeo de Virulência

3.5.3.1 Enterohemolisina (gene *hlyA*)

Todas as cepas de *Escherichia coli* O157:H7 possuem um plasmídeo altamente conservado denominado pO157 com aproximadamente 100 kilobases. Um plasmídeo semelhante é encontrado em muitas STEC não-O157. O plasmídeo pO157 contém vários genes que codificam potenciais fatores de virulência. Estes genes incluem *espP* (codifica a serina extracelular), *katP* (catalase-peroxidase), *hlyA* (enterohemolisina) e *etp* (secreção de proteínas tipo II).

O fenótipo enterohemolítico típico de STEC é visualizado após incubação da bactéria a 36°C durante 18 a 24 horas em meio sólido preparado com eritrócitos lavados. Caracteriza-se por pequenas zonas turvas de hemólise ao redor do crescimento bacteriano. A enterohemolisina fraca e com aspecto turvo produzida pelas cepas STEC são diferenciadas das outras cepas de *E. coli* alfa hemolítica, por meio da semeadura em placas de ágar sangue comum (com hemácias não lavadas e sem CaCl₂) (Ministério de Salud da Argentina, 2000).

3.5.3.2 Gene *Saa*

Recentemente, foi descrito um novo tipo de adesina autoaglutinante, denominada *Saa* como fator de virulência em cepas STEC LEE-negativa, sendo relatado como virulento para humanos. O gene *saa* apresenta localização plasmidial (PATON *et al*, 2001).

3.5.4 Ácido resistência

Outros fatores são importantes na patogênese da STEC. Tais fatores estão relacionados a resistência do pH ácido tanto do estômago quanto dos alimentos ácidos como suco de maçã. Esta característica parece ser bastante variável entre as STECs (WHO, 1998).

3.6 FONTES DE INFECÇÃO HUMANA E FORMAS DE TRANSMISSÃO

3.6.1 Reservatório

Apesar de ORSKOV *et al.*, (1985) terem descrito inicialmente a *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos com sinais de colibacilose, estudos posteriores revelaram a alta frequência desse organismo nas fezes de animais assintomáticos, caracterizando a espécie bovina, do ponto de vista epidemiológico, como o principal reservatório do agente (RIBEIRO *et al.*, 1999).

BREES *et al.*, (2000) analisaram nas células de tecidos bovinos a presença do receptor Stx denominado de globotriosil ceramida (Gb₃), para receptividade da toxina Shiga “*in vitro*” e para a susceptibilidade dos efeitos da enterotoxina “*in vivo*”. Por meio de imunohistoquímica, foi concluído que estes animais não possuem receptores Gb₃ no intestino, mas apenas no cérebro e no rim e por esta razão não desenvolvem doença entérica.

Atualmente pesquisas procuram esclarecer o mecanismo de infecção natural do bovino por cepas de STEC, bem como a eliminação fecal do microrganismo (WHO, 1998).

REIMANN *et al.*, (1998) verificaram que o período de eliminação da STEC nas fezes do bovino pode variar entre 8 a 46 dias. Utilizando a inoculação experimental, destacou-se o caráter assintomático dos animais. A recuperação do agente ocorre exclusivamente a partir do conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos não havendo disseminação para outros órgãos. Além disso o mesmo experimento mostrou que a primo infecção não previne a reinfecção (CRAY *et al.*, 1995).

O agente está presente tanto nas fezes do gado de corte como no gado leiteiro. A excreção de cepas de STEC é mais comum em períodos quentes. A prevalência é maior em animais jovens e o agente pode permanecer viável no meio ambiente por até dois anos (HANCOCK *et al.*, 1998).

Na Tailândia RASMUSSEN *et al.*, (1993) estudando o conteúdo ruminal como reservatório de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), concluíram que quando a fermentação normal do rúmen é afetada, a população de enterobactérias aumenta. O estresse no transporte dos animais e a privação de alimento contribui para este processo. O manejo antes do abate pode influenciar na atividade fermentativa do trato digestório predispondo o animal a infecção e a contaminação do meio. Utilizando a metodologia de PCR, aqueles autores encontraram 50% de positividade nos animais no abatedouro. Mas 18% dos animais foram positivos quando amostrados ainda na fazenda.

LEOMIL *et al.*, (2003) realizaram um estudo com 344 amostras fecais de bezerros, sendo 139 animais diarreicos e 205 animais não diarreicos. 12,7% do total de animais foram positivos para a produção de Stx, ocorrendo maior positividade na população diarreica (20%) em comparação com animais não diarreicos (7,8%). Alguns sorotipos encontrados como O111:NM; O111:H8 e O118:H16 já foram descritos como enterohemorrágicos.

A dieta alimentar do animal está diretamente relacionada à excreção de cepas de STEC. Existem conflitos de informações sobre o efeito da dieta do gado, principalmente do rebanho confinado. A influência da dieta está na habilidade da *Escherichia coli* em desenvolver resistência ao pH ácido, aumentando o risco de doenças de origem alimentar no humano (CRAY *et al.*, 1995).

Normalmente a acidez estomacal é uma barreira efetiva à infecção dos patógenos alimentares. Porém a adaptação que este grupo de bactérias sofreu no rúmen do bovino as tornam capazes de sobreviver a este mecanismo de defesa (CRAY *et al.*, 1995).

GONZALEZ *et al.*, (1998) demonstraram que o fornecimento ao gado de uma dieta rica em grãos acidifica o ambiente do cólon. Este processo ocorre porque os animais não digerem completamente o amido contido nos grãos. Quando o amido alcança o cólon ocorre a produção de ácidos de fermentação, induzindo e

selecionando a resistência na população de *Escherichia coli*. Da mesma forma RICHTER *et al.*, (2000) apontaram que o uso exclusivo de cereais na alimentação bovina aumenta a concentração de *Escherichia coli* nas fezes.

Uma dieta a base de feno não forma resíduo a ser fermentado no cólon. Desta forma o nível de ácido permanece baixo e a *Escherichia coli* permanece ácido-sensível. Portanto alimentar animais com feno pelo menos cinco dias antes do abate diminui o risco de contaminação por cepas de STEC (GONZALEZ *et al.*, 1998).

Para evitar a contaminação na linha de abate com as cepas de STEC são necessárias estratégias inter-relacionadas como a diminuição do número de animais confinados e a melhora da higiene e do manejo (CRAY JR, 1998).

Nos Estados Unidos, ELDER *et al.*, (2000) relatam uma significativa correlação entre a prevalência de STEC nas fezes atingindo a pele e a carcaça. A contaminação na pele justifica-se devido ao transporte dos animais até o frigorífico, sendo realizado de maneira inadequada estressando os animais e promovendo o contato direto entre os reservatórios. A contaminação cruzada da carcaça ocorre geralmente nos animais já considerados positivos. Esta informação sugere a contaminação durante o processo de abate. Estes pesquisadores apontam que de um total de 341 amostras de carcaça e pele bovina, pesquisadas em um frigorífico, foram observados 46,3% de positividade para o sorotipo O157:H7 (ELDER *et al.*, 2000).

Na Argentina a análise de 59 amostras fecais de bovinos criados a pasto mostrou que 62,7% dos animais eram carreadores de cepas de STEC, sendo o sorotipo O157:H7 encontrado em 6,8% dos animais (PADOLA *et al.*, 2003). Enquanto GIOFFRÉ *et al.*, (2002) analisaram 160 amostras de swab retal de bovinos, mas não isolaram nenhuma STEC sorotipo O157:H7. Já BLANCO *et al.*, (2003) caracterizaram 134 STECs isoladas de bovinos, alimentos e humanos na Argentina, sendo que destas amostras 5 (3,7%) pertenciam ao sorotipo O157:H7.

Amostras de retalhos de carne foram avaliadas num frigorífico na Nova Zelândia e testadas para presença de toxina Shiga, produção de enterohemolisina e presença do gene *eae*. Foram isoladas 18 cepas STEC, sendo 12% obtidas de carne bovina, 17% de cordeiros e 4% de carne suína (BROOKS *et al.*, 2001).

No Japão, foram estudadas 387 amostras de carne bovina, onde 24,3% apresentaram positividade para toxina Shiga e 1,8% pertenciam ao sorotipo O157:H7. Estes resultados sugerem que a STEC está largamente distribuída no mundo (MIYAO *et al.*, 1998).

Pesquisas realizadas na Itália com 450 amostras de fezes bovinas demonstraram que 16,6% das amostras positivas para *Escherichia coli* O157 provinham de gado de corte e 16,1% eram originários do rebanho leiteiro sendo que a maioria dos resultados positivos foram obtidos no verão (BONARDI *et al.*, 1999).

Na Índia foram investigados, por meio da PCR, cepas de STEC não pertencente ao sorotipo O157:H7 de bovinos saudáveis, carne bovina crua e pacientes diarreicos. 18% das amostras bovinas, 50% dos alimentos e 1,4% dos pacientes apresentaram positividade para STEC (KHAN *et al.*, 2002)

Embora o bovino seja considerado o reservatório principal, alguns isolamentos provêm de ovelhas, cães, cavalos, aves, cervo e logicamente humanos (HANCOCK *et al.*, 1998). A epidemiologia do agente em ovelhas é similar aos bovinos (HANCOCK *et al.*, 1998).

BEERY *et al.*, (1985) obtiveram indícios de que aves podem servir de reservatório para cepas STEC, já que este patógeno é capaz de colonizar o ceco de galinhas, sendo eliminado pelas fezes.

Estudos consideraram a mosca (*Musca Doméstica*) um possível vetor mecânico de cepas de STEC. Trabalho realizado por BUMA *et al.*, (2000), no Japão, isolou seis cepas de STEC do corpo e das fezes de moscas encontradas em uma fazenda de produção leiteira, destas duas cepas pertenciam ao sorotipo O157:H7. Este trabalho sugere uma forma de difusão mecânica das cepas no ambiente.

3.6.2 Alimentos

A principal via de transmissão do agente infeccioso é representada pelo consumo de alimentos contaminados direta ou indiretamente por fezes bovinas (WHO, 1998).

Nos Estados Unidos da América, desde 1982, mais de 100 surtos de infecção por STEC foram notificados. Em 52% destes a fonte de infecção foi

alimento de origem animal, 16% com transmissão pessoa a pessoa, 14% por meio de alimentos de origem vegetal e frutas e 12% por água (WHO, 1997 e TAUXE, 1997).

A contaminação de carcaças bovinas no processo de abate com fezes de animais portadores associado ao consumo de produtos e subprodutos cárneos, sem apropriado processo térmico na preparação, permite a manutenção do microrganismo no interior da carne e a relação tempo/temperatura do processamento pré-consumo não é suficientemente adequado para a inativação microbiana (HART *et al.*, 1997).

Embora diferentes estudos tenham associado o consumo de leite bovino a casos de doença humana, não foi elucidado se cepas STEC poderiam ser consideradas agentes primários de mastite bovina (com conseqüente eliminação pelo leite), ou, o que parece mais provável, ocorreria a contaminação do produto com fezes de animais infectados durante o procedimento da ordenha ou do processamento do leite e derivados, especialmente queijos (ANSAY *et al.*, 1997).

Segundo a Food and Drug Administration (FDA), dos EUA, órgão que regulamenta os padrões sanitários de alimentos e a utilização de drogas no país, os alimentos com pH inferior a 4,6 são considerados de menor risco na transmissão de patógenos de origem alimentar. Contudo, surtos recentes envolvendo cepas STEC têm revelado que esse organismo pode manter-se viável em alimentos com baixo pH, como suco de maçã (pH entre 3,7 a 3,9) ou superfícies de maçãs consumidas sem lavagem adequada e sem a utilização de preservantes (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A tolerância das cepas STEC ao pH ácido foi corroborada em investigação de surto de doença humana relacionado ao consumo de maionese e molhos, que apresentavam pH entre 3,6 a 3,9 e 3,6 a 4,4 (WHO, 1998). Outros estudos confirmaram que embora as cepas STEC não tenham condições de se multiplicar em condições ácidas, podem manter-se viáveis em maionese comercial, por 55 dias, a temperatura de 5°C (ZHAO *et al.*, 1993).

A identificação de cepas STEC em outros gêneros alimentícios como batata, alface e brotos, tem sido relatados (WHO, 1998).

Incidentes recentes têm demonstrado que tanto a água de consumo como centros de recreação aquática podem atuar como veiculadores do microrganismo

para o homem (FENG *et al.*, 1996). A primeira descrição de surto por cepa de STEC (O157:H7) relacionado ao consumo de água foi registrada em Missouri, nos EUA. Aproximadamente 240 pessoas foram infectadas, das quais mais de 32 hospitalizadas, com evolução fatal em quatro pacientes. A fonte de infecção não foi determinada, e ainda que este grupo seja susceptível aos efeitos do cloro (como as demais cepas de *E. coli*), acredita-se que a deficiência na proporção do produto adicionado à água tenha permitido a manutenção do agente (SWERDLOW *et al.*, 1992).

WANG *et al.*, (1998), investigando a viabilidade de cepas de STEC experimentalmente inoculadas em água filtrada (autoclavada), de reservatórios e de centros de recreação aquática, em diferentes temperaturas (8°C, 15°C e 25°C), determinaram a manutenção do agente por até 12 semanas a 8°C.

3.6.3 Contato pessoa-pessoa

Além do alimento, outra via de transmissão já documentada baseia-se no contato pessoa – pessoa (WHO, 1998), assumindo importância principalmente entre familiares, manipuladores de alimentos ou em instituições que prestam cuidados à segmentos mais susceptíveis da população como crianças, idosos, imunossuprimidos e deficientes mentais, nestes últimos, devido à dificuldade de assimilação de hábitos adequados de higiene (BELONGIA *et al.*, 1993).

3.7 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR STEC

São poucas as bactérias que, como as STEC, causam síndromes clínicas que afetam diferentes sistemas como, por exemplo, a colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO e KAPER, 1998). Além de outras manifestações clínicas como púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) e morte podem seguir da infecção por STEC (NATARO e KAPER, 1998).

As cepas STEC de um modo geral tem sido encontrada em 75 de 100% dos episódios de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) na Europa, América do Norte, Canadá e América Latina, especialmente na Argentina (LÓPEZ *et al.*, 1998).

No Brasil existem poucos dados sobre a das STEC. Estudos realizados em São Paulo com amostras de fezes de crianças com diarreia apontam frequências de cepas STEC menores de 1% (GIRALDI *et al.*, 1990; GUTH *et al.*, 1994 e GOMES *et al.*, 1991).

No período compreendido entre 2000 e 2002, em São Paulo, foi realizado estudo com fezes de crianças apresentando diarreia. Foram isoladas nove cepas de STEC pertencentes aos sorotipos: O26:H11, O77:H18, O103:H16, O157:H7 e ONT:H2. A expressão da toxina Shiga e o gene *hlyA* foi confirmada em todas as cepas. Todas as cepas STEC possuíam o gene *eae*, exceto o sorotipo O77:H18 (VAZ *et al.*, 2003).

Segundo revisão realizada na Argentina nos últimos 30 anos, a incidência de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em crianças de até quatro anos é a maior encontrada no planeta. Este estudo ocorreu na capital Buenos Aires e nos subúrbios e mostrou que a incidência da Síndrome Hemolítica Urêmica na Argentina parece ser 7 a 10 vezes mais alta do que se reporta em áreas de alto risco no mundo (LÓPEZ *et al.*, 1998).

LOPEZ *et al* (1998) na Argentina conduziram estudo em grupos de crianças com Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e em grupo de crianças com diarreia. Entre as crianças com Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), 57% possuíam evidências de infecção por cepas STEC. Pacientes com diarreia sanguinolenta esta percentagem é de 38,9% e em crianças com diarreia aquosa foram encontradas cepas STEC em 21%. Apenas 3% dos casos de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e 3% dos casos de diarreia foram isolados o sorotipo O157:H7 demonstrando a importância das cepas de STEC não pertencentes ao sorotipo O157:H7.

Um dado interessante sobre a Argentina está no consumo de carne bovina, sendo considerado o maior do mundo (60Kg/habitante/ano). Neste país a carne bovina é a proteína de origem animal mais barata. As crianças argentinas iniciam o consumo de carne muito cedo, 20% aos 5 meses de idade e 80% delas consomem carne três vezes por semana. Além disso, 80% da carne consumida no país não passa por inspeção adequada (LOPEZ *et al.*, 1998).

No continente Europeus estudos realizados com pacientes diarreicos, mostraram que em 10 países foram detectados cepas de *Escherichia coli* produtora

de toxina Shiga. Países como Alemanha, Noruega, Suíça e Áustria os casos de infecções excederam a 2%, enquanto que em países como Itália e Sérvia foi menos que 1%. Na maioria dos estudos a cepa STEC O157 representou menos que um terço das STECs isoladas (CAPRIOLI e TOZZI, 1998).

Os casos de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) por exigir hospitalização são mais facilmente identificáveis, sendo a SHU considerada um bom indicador da frequência de infecções por cepas STEC. Os países com maior incidência de SHU no continente Europeu são Alemanha com 19 casos para cada 100.000 crianças até 15 anos, seguida pela Holanda com 1,5 para 100.000, Suíça com 1,5 para 100.000 e Bélgica com 1,5 para 100.000. Os países do Sul da Europa possuem incidências menores ainda de SHU nessa faixa etária sugerindo uma menor frequência de infecção por cepas STEC (CAPRIOLI e TOZZI, 1998).

No Canadá as infecções por cepas STEC tem sido monitoradas desde 1990. Entre 1993 a 1995, 93% dos casos de infecções provocadas por cepas STEC foram causados pelo sorogrupo O157 e nos últimos anos tem ocorrido um declínio da incidência em razão das atividades de controle implementadas (SPIKA *et al.*, 1998). O maior surto de infecção por cepas STEC ocorrido no Canadá, foi notificado em 1991 entre os esquimós com 521 casos, sendo 22 casos de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e duas mortes (SPIKA *et al.*, 1998).

No Japão, entre 1991 a 1995, ocorreram 29 surtos provocados por *Escherichia coli* O157:H7. Quatro destes surtos ocorreram em jardins de infância, seis ocorreram em escolas primárias e 19 ocorreram entre familiares. Surtos envolvendo mais de 10 casos foram limitados em seis envolvendo escolas (MICHINO *et al.*, 1998).

Pesquisas realizadas na Austrália mostraram uma pequena incidência de cepas de STEC na região. Apenas dois surtos por STEC foram relatados. O primeiro ocorreu no sul da Austrália, no verão de 1995 apresentando 200 casos de colite hemorrágica e 22 crianças evoluíram para SHU. O sorotipo responsável foi o O111:H⁻. O segundo surto ocorreu na costa sudeste e envolveu 2 crianças com diarreia sanguinolenta. O sorotipo responsável foi O157:H7, neste surto não houve evolução para SHU. Suspeita-se que as cepas O157 australianas sejam menos virulentas, pois produzem apenas a toxina stx1, diferente do que ocorre em outros

locais onde as cepas produzem toxinas Stx2 ou Stx1/Stx2 ao mesmo tempo (ROBINS-BROWNIE *et al.*, 1998).

3.8 MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR CEPAS STEC

Sendo os ruminantes domésticos considerados os principais reservatórios da *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga, considera-se de elevada importância a segurança alimentar quando do abate e consumo da carne e produtos derivados destes animais. Os bovinos e menos importante os ovinos, são as principais fontes fecais de contaminação do alimento por cepas de *Escherichia coli* STEC. Portanto o principal objetivo preventivo concentra-se na sua redução ou mesmo na erradicação das cepas de STEC do conteúdo entérico destes animais. Existem atualmente quatro áreas de intervenção (ponto crítico) para conseguir este objetivo: 1. higiene (manejo adequado, água e alimentos limpos; 2. redução do contato entre os animais, especialmente o contato com animais selvagens e pássaros); 3. profilaxia (vacinas e probióticos), combate específico da STEC (bacteriófagos, antibióticos); 4. genética (animais STEC resistentes). Embora estas medidas sejam teoricamente capazes de reduzir a carga bacteriana entérica diminuindo a sua dispersão no ambiente, é impossível esperar a erradicação das cepas STEC somente com a combinação destas quatro medidas (WIELER, 2000).

3.9 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CEPAS STEC

Como a *Escherichia coli* faz parte da microbiota intestinal sadia, é necessária a utilização de meios de cultura específicos para identificar as cepas responsáveis por enfermidades diarréicas. Vários métodos para detecção de *Escherichia coli* Shigatoxigênica em alimentos e amostras clínicas foram e vem sendo desenvolvidos. Os métodos microbiológicos tradicionais, além de demorados, são inadequados para a detecção de pequeno número de microrganismo-alvo em presença da microbiota interferente abundante (VIEGAS, 1996). Faz-se necessário uma identificação rápida e precisa para o diagnóstico e tratamento de infecções por *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC) (TAKEDA, 1997).

Não existem características bioquímicas comuns que permitam distinguir cepas STEC comensais (PATON e PATON, 1998). A não existência de meios práticos para detecção de cepas com características de STEC impede a sua identificação na rotina (MENG e DOYLE, 1998) e não permite estabelecer estimativas precisas da incidência e prevalência em populações humanas e animais (NATARO e KAPER, 1998). No entanto, alguns meios já estão padronizados e auxiliam no enriquecimento e no crescimento destas cepas.

3.9.1 Meios de Enriquecimento Seletivo

3.9.1.1 Caldo Trypticase Soy Broth (TSB) com Novobiocina

Os meios de enriquecimento visam aumentar o número de células detectáveis e impedir o crescimento de outros organismos. Os procedimentos desenvolvidos para *Escherichia coli* O157:H7 devem ser reavaliados para outras *Escherichia coli* de diferentes sorotipos classificadas como cepas STEC não O157 (WHO, 1998). O meio indicado para enriquecimento de amostras suspeitas é o Caldo Trypticase Soy Broth (TSB) com novobiocina (concentração final 20mg/l), incubando a 37°C durante 18 a 24 horas (HEUVELINK *et al.*, 2001).

3.9.1.2 Separação Imunomagnética

O sistema de separação imunomagnética foi desenvolvido para atender à necessidade de separar determinadas células específicas, ou pequeno número de um determinado microrganismo, de uma amostra clínica, do alimento ou mesmo do ambiente onde esteja presente grande variedade de interferentes (DYNAL, 1996).

Este método baseia-se em duas ações principais: a captura da célula alvo por ligação imunológica utilizando imunoglobulinas específicas para detecção do sorotipo, ligadas a microesferas magnéticas e a posterior precipitação e separação por ação de forças magnéticas. A aplicação dessas duas ações leva à obtenção de efeitos de separação específica de células bacterianas permitindo a posterior concentração e purificação do microrganismo-alvo (LIU e LI, 2002). Este sistema com microesferas magnéticas oferece uma área de superfície definida para adsorção ou acoplamento de várias moléculas de imunoglobulinas (DYNAL, 1996).

A utilização do sistema de separação imunomagnética traz como vantagens: a captura do microrganismo-alvo separando-o dos demais microrganismos presentes no seu ambiente (LIU; LI, 2002). Com esta técnica aumenta a possibilidade de detecção do microrganismo alvo mesmo se houver pequeno número de células deste microrganismo em uma dada (CUBBON et al., 1996). Apesar da grande eficiência está disponível para poucos sorogrupos de *Escherichia coli*.

3.9.2 Ágar MacConkey Sorbitol (SMAC)

O Ágar MacConkey Sorbitol é o meio comumente utilizado para detecção de cepas STEC do sorotipo O157:H7 (CHAPAMN,1989; CUBBON, 1996). Diferencia-se do Ágar MacConkey tradicional ao substituir a lactose pelo sorbitol. As exigências nutricionais são similares a várias outras cepas de *Escherichia coli*, embora o sorotipo O157:H7 não fermente o sorbitol. As cepas STEC O157:H7 podem ser identificadas por meio de colônias transparentes no SMAC após 24h de incubação o que a diferencia das outras *E. coli* fermentadoras do sorbitol (DUFFY et al., 2001).

A inclusão do carboidrato ramnose e do antibiótico cefixime no SMAC, denominado CR-SMAC, auxiliaria a inibir outros organismos que também não fermentam o sorbitol, pois 60% das cepas de STEC O157:H7 não fermentam a ramnose. Além disso, o cefixime inibe *Proteus* spp (CHAPMAN *et al.*, 1991).

Outra modificação realizada no SMAC, inclui além do cefixime o telurito de potássio, criando o meio CT-SMAC (FUKUSHIMA e GOMYODA, 1999). Este inibe a multiplicação de outras *Escherichia coli*, permitindo o crescimento apenas do sorotipo O157:H7 (ZADIK *et al.*, 1993)

3.9.3 Ensaio de Citotoxicidade em Células Vero

Existem mais de 100 sorotipos de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) associados a doenças em humanos (STROCKBINE *et al.*, 1998).

As toxinas Shiga (Shiga-like toxin) produzem efeitos citotóxicos característicos em células Vero derivadas do rim de macaco e células Hela. Testes de neutralização utilizando anticorpos específicos, anti-Stx1 ou Stx2, neutralizando seus efeitos citotóxicos são métodos sensíveis e específicos para a detecção de infecções por cepas de *Escherichia coli* caracterizadas como STEC (COHEN, 1996 e PARK *et al.*, 1999). A descoberta de que as variantes da Stx2 tem uma reduzida citotoxicidade para células Hela indica a cultura em células Vero como o método de escolha (STROCKBINE *et al.*, 1998).

Segundo KONOWALCHUK *et al.*, (1977) o teste de citotoxicidade em célula Vero é altamente sensível, sendo o método padrão para a identificação da presença da toxina Shiga. Este fenômeno é possível devido a alta concentração de receptores para Stx (Gb₃) na membrana das células Vero. Este fato foi confirmado por ROBERT *et al.*, (2001) que realizaram estudo comparativo entre diferentes tipos de células incluindo Caco-2, Vero, Hela e Int-407, com objetivo de determinar em menor tempo e com maior qualidade o efeito citotóxico das cepas STEC. O teste com célula Vero apresentou maior sensibilidade frente a toxina Shiga.

3.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase

A capacidade das cepas STEC de causar infecções entéricas humanas mesmo quando em pequena dose infectante exigem o desenvolvimento de testes capazes de detectá-los independentemente do número de células presentes em alimentos, fezes de animais ou mesmo no meio ambiente (SMITH *et al.*, 1998). Um dos primeiros ensaios de PCR foi desenvolvido para detectar os genes *stx1* e *stx2* em amostras clínicas (STROCKBINE *et al.*, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos principais métodos moleculares para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (PARK *et al.*, 1999). Esta técnica apresenta como vantagens a especificidade e sensibilidade bem como a rapidez na sua execução (PATON e PATON, 1998). Por outro lado apresenta como desvantagem a presença de inibidores da reação presentes na própria amostra e a facilidade de contaminação durante o processo (BRIAN *et al.*, 1992). Além disso a seqüência a ser escolhida para o iniciador (primer) deve conter uma região bastante conservada para que não ocorra a diminuição na eficiência do anelamento, não diminuindo assim a sensibilidade da reação (PATON e PATON, 1998).

Com a finalidade de aprimorar a técnica a PCR Multiplex, é uma variação do ensaio da PCR, foi desenvolvida e permite a detecção de vários fatores de virulência. Isto ocorre utilizando combinação de primers específicos para cada gene (PATON e PATON, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BASES FÍSICAS LABORATORIAIS

A parte experimental de isolamento e tipagem sorológica das cepas suspeitas foi realizada no Setor de Microbiologia Clínica do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) do Instituto de Saúde do Paraná (ISEP). O teste de citotoxicidade em célula Vero foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). O trabalho com a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e a estocagem das cepas foi realizada no Laboratório de Bacteriologia e Micologia Veterinária do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

4.2 CÁLCULO DA AMOSTRAGEM MÍNIMA

Foram coletadas amostras fecais de 193 animais, de acordo com o número estabelecido para o cálculo de amostra mínima.

O universo amostral foi calculado com base no programa Epi Info versão 6.0, programa de processamento de texto, banco de dados e estatística para saúde pública utilizado no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) do governo federal dos Estados Unidos da América (EUA). Foi estabelecido um nível de confiança de 95% e um erro tolerável de 5% para uma população amostral estimada em 6.000 animais e uma prevalência esperada de 1% de animais infectados por cepas STEC. A prevalência esperada foi estimada com base nos resultados dos estudos de SILVA, 2002 e CERQUEIRA, 2000 no Paraná e Rio de Janeiro, respectivamente. Portanto, o tamanho da amostra mínima calculada foi de 193 animais.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS FECAIS BOVINAS POR AMOSTRAGEM

As amostras fecais foram obtidas em matadouro da região metropolitana de Curitiba e fazendas de bovino utilizados na produção leiteira no estado do Paraná. A coleta das amostras foi iniciada em dezembro de 2002 e finalizada em novembro de 2003.

Foram processadas e analisadas 5 amostras por semana no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, com exceção do mês de outubro de 2003, totalizando 193 amostras.

As amostras originárias do matadouro frigorífico foram obtidas por meio de amostragem sistemática na linha de abate, antes da oclusão higiênica do reto após a devida dessensibilização. Calculou-se o intervalo de seleção por meio do número de animais a serem abatidos no dia e divididos por cinco, ou seja, o número de amostras a serem enviadas ao laboratório na semana. A determinação foi definida por amostragem aleatória simples de um número do intervalo de seleção previamente calculado.

As amostras provenientes de propriedades da região sudoeste foram coletadas totalizando os animais da propriedade, escolhendo animais aleatoriamente.

4.4 TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram obtidas por swab retal e colocadas em tubos de ensaio com meio de transporte de Cary-Blair (ANEXO 1- item 1.1). Para se obter a amostra, o swab foi umedecido no próprio meio de transporte e então introduzido no reto do animal. O swab foi acondicionado no meio, assegurado-se que o material fecal estava visivelmente presente no swab (LEW *et al*, 1990).

Estes tubos foram encaminhados ao Laboratório Central do Estado (LACEN) sendo processados no prazo máximo de seis horas após a coleta.

4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

A técnica do isolamento em Ágar MacConkey sorbitol (SMAC) foi baseada no método preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – SP) por meio do “Manual Laboratorial de Agentes Patogênicos de Doenças Veiculadas por Alimentos” (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000), “Manual de Procedimentos para Diagnóstico de *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga” do Ministério da Saúde da Argentina.

4.5.1 Isolamento em Ágar MacConkey sorbitol (SMAC)

As 193 amostras fecais bovinas foram semeadas em meio de cultivo seletivo SMAC (ANEXO 1- item 1.2) e incubadas a 36°C por 18 a 24 horas.

Todas as colônias isoladas não fermentadoras do sorbitol (colônias transparentes) e três a cinco colônias fermentadoras do sorbitol (colônias rosa) foram selecionadas para posterior triagem bioquímica.

4.5.2 Triagem bioquímica para *Escherichia coli*

A triagem bioquímica presuntiva inicial consistiu na incubação das colônias suspeitas em tubos de ensaio contendo o meio de Rugai modificado também denominado de meio E.P.M. (Escola Paulista de Medicina) (ANEXO 1 – item 1.3) e o meio MILI (motilidade, indol, lisina) (ANEXO 1 – item 1.4). As interpretações bioquímicas dos meios utilizados estão descritos no ANEXO 2. Paralelamente as colônias suspeitas foram semeadas em Ágar TSA (ANEXO 1 – item 1.5), utilizado para a realização da sorologia. Estes tubos foram incubados a 36°C durante 18 a 24 horas.

As colônias bioquimicamente compatíveis com *Escherichia coli* foram submetidas à sorologia com antisoro O157.

4.5.3 Sorologia para o antígeno somático O157

As colônias compatíveis com *Escherichia coli* foram semeadas em Ágar TSA e incubadas por 24 horas e então emulsionadas em 500 μ L de solução fisiológica (ANEXO 1- item 2.0) formando uma suspensão densa. Parte dessa suspensão foi transferida para dois quadrados de uma placa de vidro quadriculada (2cm X 2cm) com auxílio de uma pipeta de Pasteur. A um deles foi adicionada uma gota do antisoro O157 (soro aglutinante anti - *E. coli* O157K, polivalente EHEC, lote n.º 05-02) e ao outro uma gota de solução salina (ANEXO 1 – item 1.7).

A homogeneização total foi obtida fazendo movimentos circulares na placa sendo observado o curso da reação de aglutinação por até 3 minutos. A leitura foi realizada no quadrante com soro e comparada com a ausência de aglutinação no quadrante com solução salina. Suspensões bacterianas que aglutinaram simultaneamente nos dois quadrantes foram interpretados como cepas autoaglutinantes, sendo descartadas.

Em caso de aglutinação no quadrante com antisoro O157 as cepas contidas nas suspensões foram submetidas a provas bioquímicas complementares (ANEXO 1 – item 1.8), devido a possibilidade de reação cruzada, principalmente, com *Escherichia hermanii*. A interpretação das provas complementares encontra-se no ANEXO 2 – item 2.3. O fluxograma de isolamento, identificação bioquímica e sorológica das colônias quanto ao sorotipo O157:H7 estão apresentados na FIGURA 1.

O controle positivo foi utilizada a estirpe de STEC O157:H7 EDL 933 (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo), e a *Escherichia coli* ATCC 25922 cepa não produtora de toxina Shiga adquirida comercialmente, foi utilizada como controle negativo.

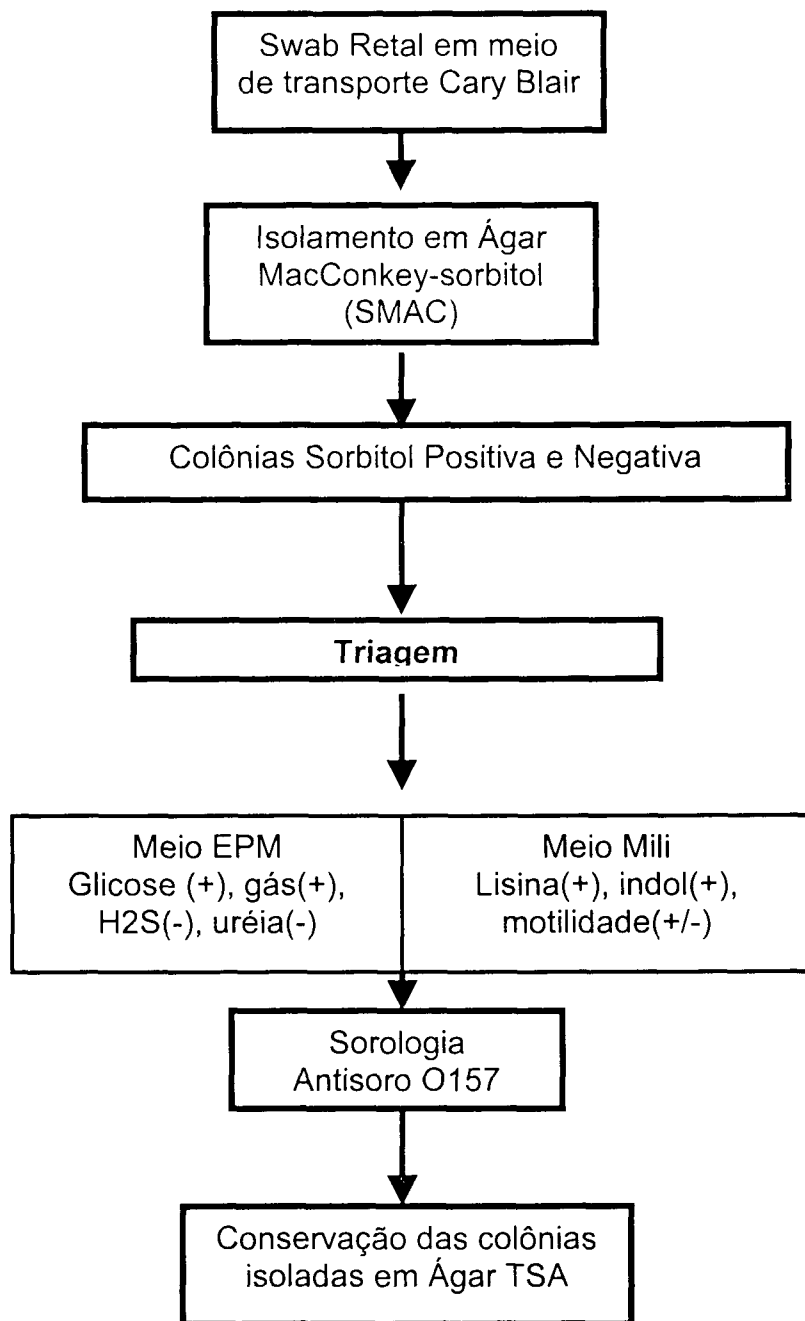


FIGURA 1 – ORGANOGRAMA DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM AMOSTRAS FECAIS.

4.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULA VERO

As colônias sorbitol negativo e positivo, oriundas de 193 amostras fecais bovinas, foram analisadas por meio do ensaio de citotoxicidade em células Vero, segundo KARMALI *et al.*, 1985. Nas células Vero foi observado o efeito citotóxico provocado pela ação da toxina Shiga.

4.6.1 Extração da toxina Shiga a partir das colônias isoladas.

Colônias isoladas foram inoculadas em 10ml de caldo Penassay (meio com antibiótico nº3, marca Difco) (ANEXO 1-item1.9) e incubadas a 36°C durante 18 a 24horas. Após foi realizado o subcultivo em Erlemeyer com capacidade para 250ml. Neste frasco foi adicionado 25ml de caldo Penassay e os 10ml que continham a suspensão bacteriana. O Erlemeyer foi incubado a 37°C durante 18horas com agitação (150 rpm) de modo a possibilitar a aeração do cultivo e a produção máxima da toxina (KARMALI *et al.*, 1985).

Esta suspensão cultivada em aeração foi centrifugada a 8000rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi separado em tubo estéril. Após foi realizada a filtração em membrana de nitrocelulose com 0,22 μ de porosidade sendo filtrada e conservada a -20°C até a realização do ensaio de citotoxicidade.

4.6.2 Ensaio de citotoxicidade

No ensaio de citotoxicidade foi utilizada a técnica de cultivo celular em microplacas com células Vero com 24horas de repique (ANEXO 3). Foram semeadas 150 μ l de uma suspensão de células por poço contendo 1.10^5 cel/ml e meio de manutenção de Eagle (ANEXO 3) em microplaca e incubados a 37°C por 24horas.

Foram adicionados 50 μ L do filtrado obtido no item 4.6.1 em cada poço obtendo-se uma diluição de 1:4. Este procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica. As microplacas foram incubadas a 37°C, 24 e 48horas em estufa com 5% de CO₂. A leitura foi realizada em microscópio ótico invertido após 24 e 48horas com observação da destruição ou não da monocamada celular.

Como controle positivo foi utilizada a estirpe de STEC O157:H7 EDL 933, (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo) e a *Escherichia coli* ATCC 25922 cepa não produtora de toxina Shiga adquirida comercialmente, foi utilizada como controle negativo.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As cepas isoladas que apresentaram positividade no ensaio de citotoxicidade foram analisadas por meio do teste de PCR. Nas amostras negativas no ensaio de citotoxicidade foi realizado um “pool” de colônias crescidas sobre o Ágar TSA para a realização da análise por PCR.

4.7.1 Extração do DNA

A extração do DNA, foi realizada por meio do método da fervura, segundo OLSVICK e STROCKBINE,1993. As cepas isoladas que apresentaram produção de toxina Shiga e os “pools” negativos para produção da toxina foram suspensos em 500uL de água destilada estéril, submetidas à fervura durante 20 minutos e a suspensão centrifugada a 10.000rpm durante um minuto. O sobrenadante foi transferido para novo tubo eppendorf e conservado a -20°C . Este material foi utilizado na reação de PCR.

4.7.2 Iniciadores Utilizados

A seqüência de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados foi descrita por LINN (citado por BASTIAN *et al.*, 1998) (TABELA 4). O iniciador stx b foi modificado no presente trabalho para permitir a detecção da variante stx1c. O sexto nucleotídeo a partir da extremidade 3' era o nucleotídeo A proposto por LINN. Com a modificação realizada neste trabalho, os nucleotídeos A ou C podem estar presentes naquela posição, com freqüência de 50%, (TABELA 4). Este par de iniciadores permite a amplificação de um fragmento de aproximadamente 900 pb do gene stx (896 nucleotídeos do gene stx1 com início no nucleotídeo 280 da subunidade A ao nucleotídeo 1176 da subunidade B e 875 nucleotídeos do gene

stx2 com início no nucleotídeo 280 da subunidade A ao nucleotídeo 1155 da subunidade B). A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada pela empresa Invitrogen, São Paulo – SP.

TABELA 4 - INFORMAÇÕES DOS INICIADORES UTILIZADOS NA PCR.

Primer	Seqüência de Oligonucleotídeos	Localização no Gene	Tamanho
stx a	3' GAACGAAATAATTTATATGT 5'	280-1176	896
stx b	5' TTTGATTGTTAC(A/C)AGTCAT 3'	280-1155	875

Os volumes e concentrações utilizadas na reação de PCR estão descritos na TABELA 1 do ANEXO4.

4.7.3 Protocolo de Amplificação

A PCR foi realizada em termociclador Hybaid Omni Gene e as condições de amplificação estão descritas na TABELA 5.

TABELA 5- PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

ETAPA	CONDIÇÕES	CICLOS
Desnaturação	94°C, 5min	1
Desnaturação	94°C, 1min	35
Anelamento	42°C, 1min	
Extensão	72°C, 1min	
Extensão	72°C, 10min	1

Após a amplificação a detecção dos produtos da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% e a corrida eletroforética foi realizada a 37V durante 1 hora (ANEXO 4).

O controle positivo foi utilizada a estirpe de STEC O157:H7 EDL 933 (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo), e a *Escherichia coli* ATCC 25922 cepa não produtora de toxina Shiga adquirida comercialmente, foi utilizada como controle negativo.

4.8 CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DE PCR

Os valores da sensibilidade e especificidade da técnica de PCR em relação ao Ensaio de Citotoxicidade em Células Vero, considerada a metodologia padrão ouro, foram obtidos segundo FORBES *et al.*, 1998 conforme a TABELA 6:

TABELA 6- CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DE PCR

		Ensaio de Citotoxicidade em Células Vero	
		Positivo	Negativo
PCR	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

onde VP: verdadeiro positivo

VN: verdadeiro negativo

FP: falso positivo

FN: falso negativo

Fórmula para o cálculo da sensibilidade e especificidade:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

4.9 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE CEPAS STEC EM FUNÇÃO DAS TEMPERATURAS MÉDIAS AMBIENTAIS.

Foram analisados por meio do cálculo estatístico do Qui quadrado, a frequência de isolamento de cepas STEC em períodos do ano com temperatura média alta (21°C) e com temperatura média baixa (13°C).

Para o cálculo estatístico do Qui quadrado (X^2) foi utilizado o programa StatSoft, Inc. (1996). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., WEB: <http://www.statsoftinc.com>.

As amostras foram coletadas respeitando uma distribuição homogênea ao longo do tempo.

5 RESULTADOS

5.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS FECAIS

Swabs fecais de 193 bovinos foram analisados quanto a presença de cepas STEC. A população amostral atingiu todas as regiões do estado do Paraná. Os animais foram provenientes de 43 municípios: Chopinzinho, Fazenda Rio Grande, Uniflor, Santo Antônio da Platina, Guapirama, Alto Paraná, Guarapuava, Cerro Azul, Tibagi, Ribeirão Claro, Palmital, Paranavaí, Loanda, Ponta Grossa, Reserva do Iguaçu, Rio Bonito do Iguaçu, Salto do Itararé, Três Barras, Santana do Itararé, Querência do Norte, Altamira do Paraná, Clevelândia, Balsa Nova, Teixeira Soares, Siqueira Campos, Laranjal, Guaraniaçu, São João da Boa Vista, Sapopema, São José dos Pinhais, Palmeira, Honório Serpa, Planaltina, Espigão Alto do Iguaçu, Campina do Simão, Carambeí, Cerro Azul, Sulina, Arapoti, Foz do Jordão, Quatiguá, Tomazina. A população amostral abrangeu 142 (73%) animais adultos e 51 (27%) bezerros com menos de 2 meses de idade.

5.2 TRIAGEM DAS AMOSTRAS PARA *Escherichia coli* STEC O157:H7 EM SMAC

Foram analisadas um total de 563 colônias oriundas das 193 amostras de fezes bovinas, com fenótipo sorbitol positivo e negativo em Ágar MacConkey sorbitol (SMAC) caracterizados como *Escherichia coli* tendo sido testadas quanto à presença do antígeno somático O157.

Entre as 563 colônias analisadas, nenhuma apresentou aglutinação frente ao antisoro O157, indicando que estirpes de STEC O157 não estavam presentes entre colônias isoladas de fezes bovinas estudadas.

A FIGURA 2 mostra as características coloniais pertencentes ao sorotipo O157:H7 não fermentadoras do sorbitol, utilizados como controle positivo.

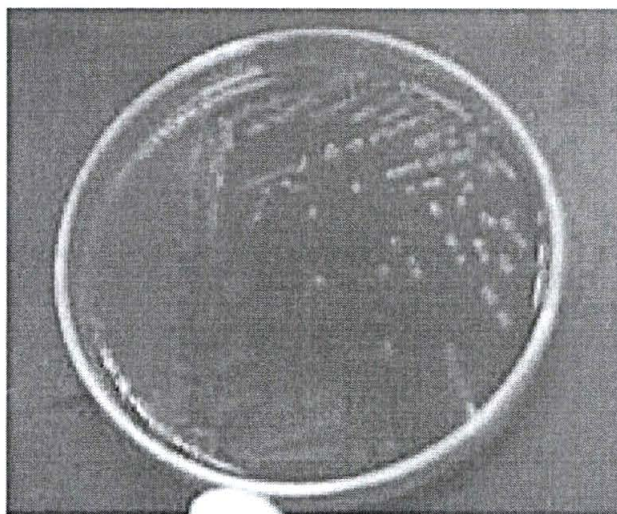


FIGURA 2 – *Escherichia coli* O157:H7 EM ÁGAR MACCONKEY SORBITOL

5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

Igualmente no ensaio de citotoxicidade em células Vero foram analisadas as 563 cepas originárias de 193 amostras fecais bovinas.

Observou-se o efeito citotóxico em cepas provindas de 66 (34%) das amostras fecais, indicando a produção de toxina Shiga. A FIGURA 3 representa os resultados obtidos por mês durante o período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, exceto outubro de 2003. No mês de dezembro foram coletadas 10 amostras e destas uma apresentou atividade citotóxica; no mês de janeiro de 2003, 15 amostras foram trabalhadas sendo 9 positivas; em fevereiro 21 amostras foram coletadas sendo 14 positivas; no mês de março 14 amostras foram trabalhadas e destas 5 foram positivas, já no mês de abril 11 amostras foram positivas em 24 amostras analisadas; em maio 15 amostras foram trabalhadas sendo uma positiva; em junho 21 amostras foram coletadas e 7 foram positivas; em julho 35 amostras foram coletadas e 8 foram positivas; em agosto 11 amostras foram trabalhadas sendo 10 positivas; em setembro 26 amostras foram coletadas e nenhuma apresentou positividade; no mês de outubro não houve coleta e finalmente no mês de novembro de 2003 uma amostra foi analisada tendo resultado negativo.

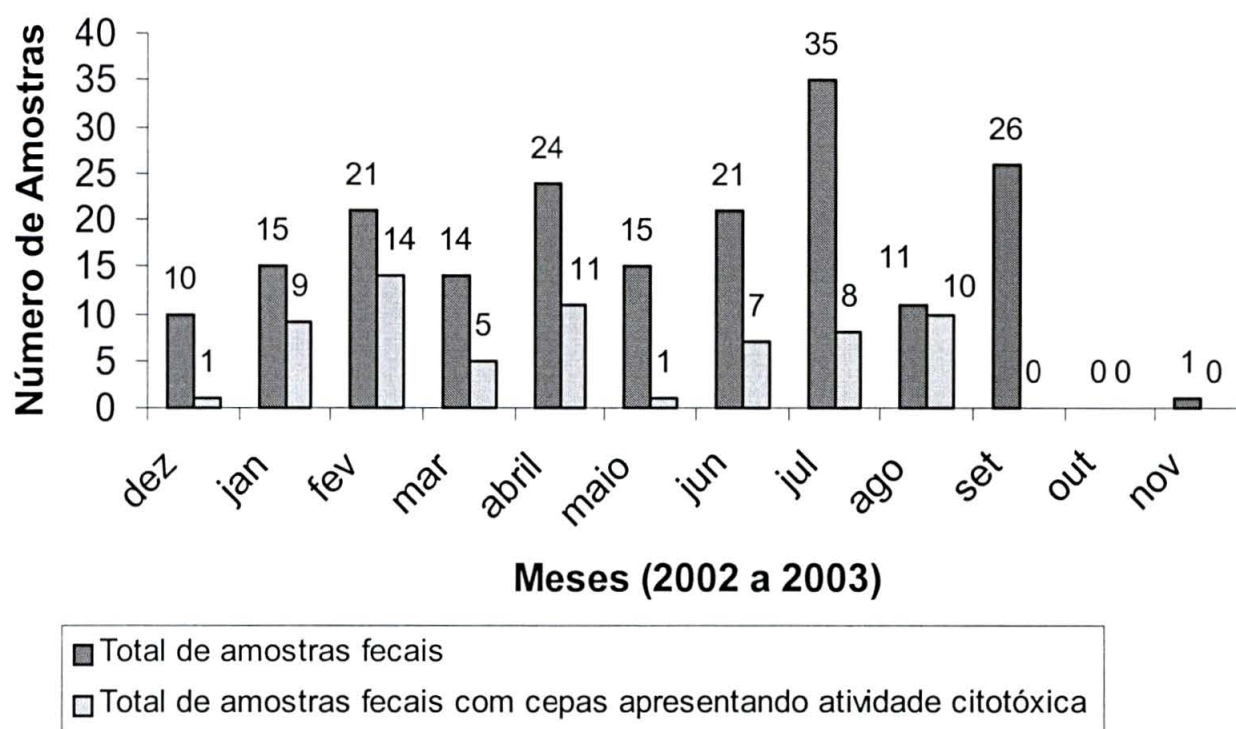


FIGURA 3 – FREQUÊNCIA MENSAL DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA UTILIZANDO O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2002 A NOVEMBRO DE 2003.

Das 193 amostras analisadas 142 eram provenientes de animais adultos e 51 amostras de bezerros com menos de 2 meses de idade. No ensaio de citotoxicidade em células Vero as 66 amostras positivas foram isoladas de animais adultos, sendo que nenhum bezerro apresentou positividade como demonstra a TABELA 7.

TABELA 7 - FREQUÊNCIA DE *E. coli* STEC EM ANIMAIS ADULTOS E BEZERROS PELO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO EM DEZ DE 2002 A NOV DE 2003 NO ESTADO DO PARANÁ

	Total de Amostras	Citotoxicidade positiva
Animais Adultos	142	66 (46,5%)
Bezerros com menos de 2 meses	51	0 (0%)

5.4 DETECÇÃO DOS GENES *stx*

Os ensaios de PCR realizados com DNA proveniente de colônias isoladas das 193 amostras fecais de bovinos sadios indicaram que 81 delas (42%) existiam cepas portadoras dos genes *stx*. As cepas positivas no ensaio de citotoxicidade foram testadas na PCR. Já amostras negativas na citotoxicidade foram analisadas “pool” de cepas, em caso de positividade na PCR eram analisadas colônias isoladas. Resultados representativos das análises estão mostrados na FIGURA 4.

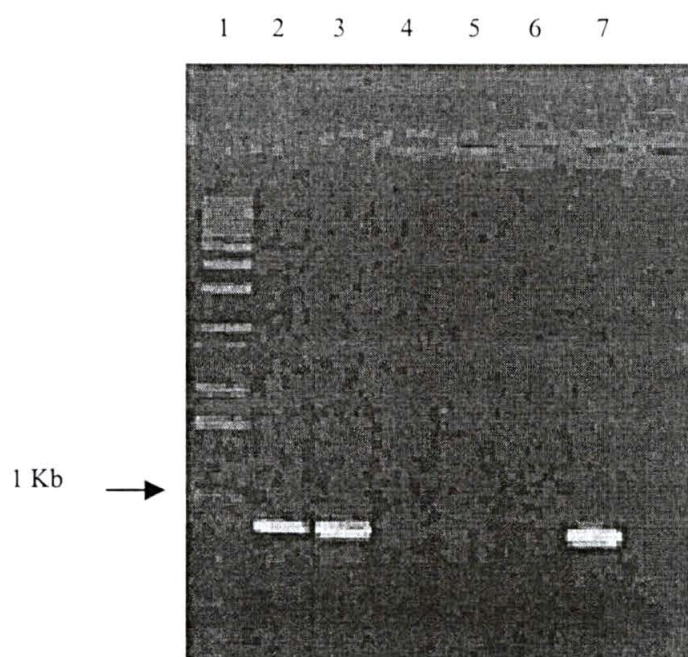


FIGURA 4- PRODUTOS DE PCR PARA GENES *stx*.

1. Marcador de peso molecular 1Kb ladder (Invitrogen); 2. Amostra 22 (banda de DNA ~ 900pb indicando a presença de STEC) 3. Amostra 170 (banda de DNA ~ 900pb indicando a presença de STEC); 4. Amostra 8 (ausência de banda de ~900pb – ausência de STEC); 5. Amostra 9 (ausência de banda de ~900pb – ausência de STEC) 6. Controle negativo *E.coli* ATCC 25992 (*stx*-) ausência de banda de amplificação; 7. Controle positivo STEC O157:H7 EDL 933 com banda de amplificação de ~900pb.

Os resultados obtidos, por mês, na PCR no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003. No mês de dezembro foram coletadas 10 amostras e destas uma apresentou atividade citotóxica; no mês de janeiro de 2003, 15 amostras foram trabalhadas sendo 9 positivas; em fevereiro 21 amostras foram coletadas sendo 13 positivas; no mês de março 14 amostras foram trabalhadas e destas 5 foram positivas, já no mês de abril 14 amostras foram positivas em 24 amostras analisadas; em maio 15 amostras foram trabalhadas sendo 6 positivas; em junho 21 amostras foram coletadas e 10 foram positivas; em julho 35 amostras foram coletadas e 8 foram positivas; em agosto 11 amostras foram trabalhadas sendo 7 positivas; em setembro 26 amostras foram coletadas e 5 foram positivas; no mês de outubro não houve coleta e finalmente no mês de novembro de 2003 uma amostra foi analisada sendo positiva como foi demonstrado na FIGURA 5.

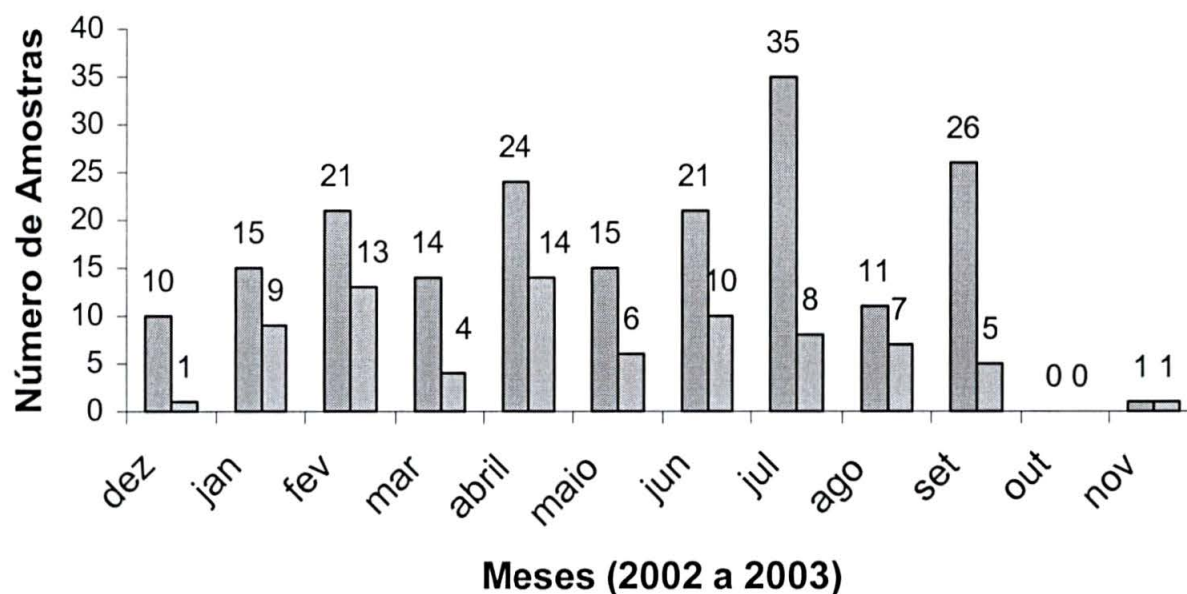


FIGURA 5 – FREQUÊNCIA MENSAL DE CEPAS STEC POR PCR NO PERÍODO DE DEZ DE 2002 A NOVEMBRO DE 2003 UTILIZANDO O INICIADOR DE LINN MODIFICADO.

Das 193 amostras analisadas 142 eram provenientes de animais adultos e 51 amostras de bezerros com menos de 2 meses de idade. Na PCR, 72 amostras das 81 positivas foram oriundas de animais adultos e 9 foram detectadas de bezerros. Estes valores estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 - FREQUÊNCIA DE *E. coli* STEC EM ANIMAIS ADULTOS E BEZERROS POR PCR EM DEZ DE 2002 A NOV DE 2003 NO ESTADO DO PARANÁ.

	Total de Amostras	Positivas na PCR
Animais Adultos	142	72 (51%)
Bezerros com menos de 2 meses	51	9 (17,6%)

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E A PCR PARA GENES *stx*.

Das 193 amostras de fezes bovinas, 66 delas foram positivas pelo ensaio de citotoxicidade em células Vero. Destas, 64 foram positivas para PCR e 2 negativas. Na técnica de PCR 81 foram positivas. Entre as 125 amostras negativas na citotoxicidade 17 foram positivas na PCR.

A FIGURA 6 (pag.52) representa a positividade mensal no ensaio de citotoxicidade em células Vero e na PCR. No mês de dezembro de 2002 e janeiro de 2003 o resultado para ambas as técnicas foi o mesmo uma amostra positiva no primeiro mês e 9 amostras positivas no segundo, em fevereiro 13 foram positivas na PCR e 14 no ensaio de citotoxicidade, em março 4 amostras foram positivas na PCR e 5 no ensaio de citotoxicidade, já em abril 14 foram positivas na PCR e 11 no ensaio de citotoxicidade, em maio 6 amostras foram positivas na PCR e apenas uma positiva no teste de citotoxicidade, em junho 10 possuem os genes *stx* e 7 apresentaram efeito citotóxico, no mês de junho ambas as técnicas apresentaram 8 amostras positivas, em agosto 7 apresentaram genes *stx* e 10 foram positivas no ensaio de citotoxicidade, setembro 5 foram positivas na PCR e nenhuma cepa apresentou atividade citotóxica, no mês de outubro não houve coleta e no mês de

novembro uma amostra positiva na PCR sendo que nenhuma foi positiva no ensaio de citotoxicidade como mostra a FIGURA 6.

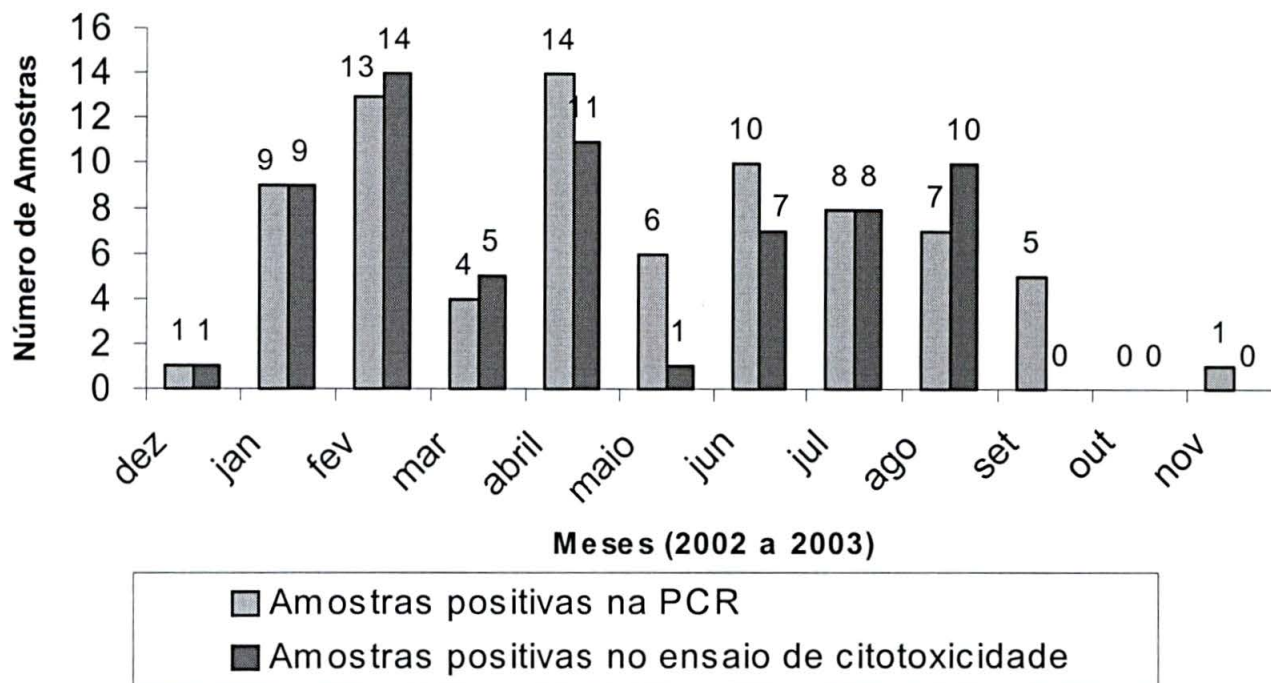


FIGURA 6 - FREQUÊNCIA MENSAL DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA COMPARANDO O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E A PCR NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2002 A NOVEMBRO DE 2003.

5.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR

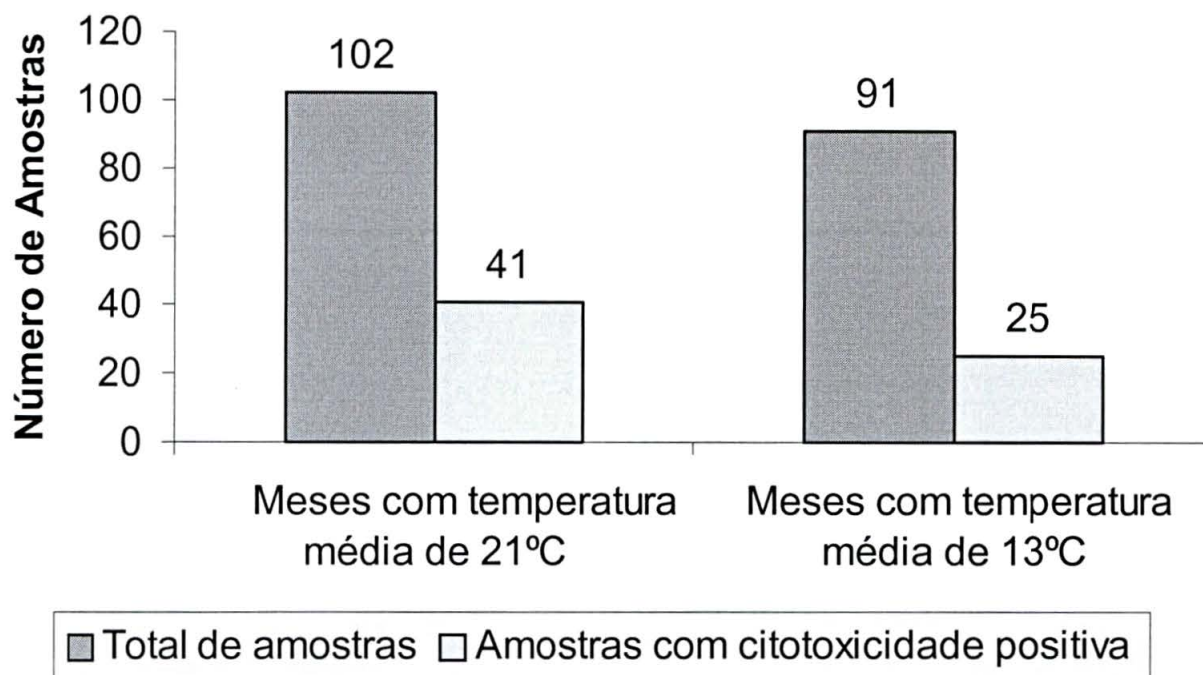
Os valores da sensibilidade e especificidade (FORBES *et al.*, 1998) da PCR em relação ao ensaio de citotoxicidade em células Vero, considerado método padrão ouro para detecção de STEC, foram apresentados abaixo:

$$\text{Sensibilidade: } \frac{VP}{VP+FN} = \frac{64}{64+2} = 0,97. 100 = 97\%$$

$$\text{Especificidade: } \frac{VN}{VN + FP} = \frac{112}{112+17} = 0,87.100 = 87\%$$

5.7 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE STEC NOS MESES DE TEMPERATURA MÉDIA DE 13°C E 21°C.

Nos meses de clima com temperatura média de 21°C foram coletadas 102 amostras sendo 41 positivas para STEC no ensaio de citotoxicidade e nos meses com temperatura média de 13°C foram coletadas 91 amostras sendo 25 positivas utilizando o mesmo método. Foi realizado o cálculo do Qui quadrado utilizando os valores supra citados não indicando diferença significativa entre os dois períodos. A FIGURA 7 demonstra a distribuição das amostras nos dois períodos.



Valor do $X^2 = 1,71$ $p=0,1910$

FIGURA 7 – FREQUÊNCIA DE CEPAS STEC PELO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO NOS MESES COM TEMPERATURA MÉDIA DE 21°C (DEZ/2002 A MAIO/2003 E NOV/2003) E MESES COM TEMPERATURA MÉDIA DE 13°C (JUN A SET DE 2003).

5.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE ISOLAMENTO DAS CEPAS STEC NOS REBANHOS ESTUDADOS.

Foram coletados amostras fecais de animais provenientes de 10 regiões do estado do Paraná: Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central, Norte Pioneiro, Centro Oriental, Oeste, Sudoeste, Centro Sul, Sudeste e região Metropolitana de Curitiba (CIGLIONI *et al.*, 2001).

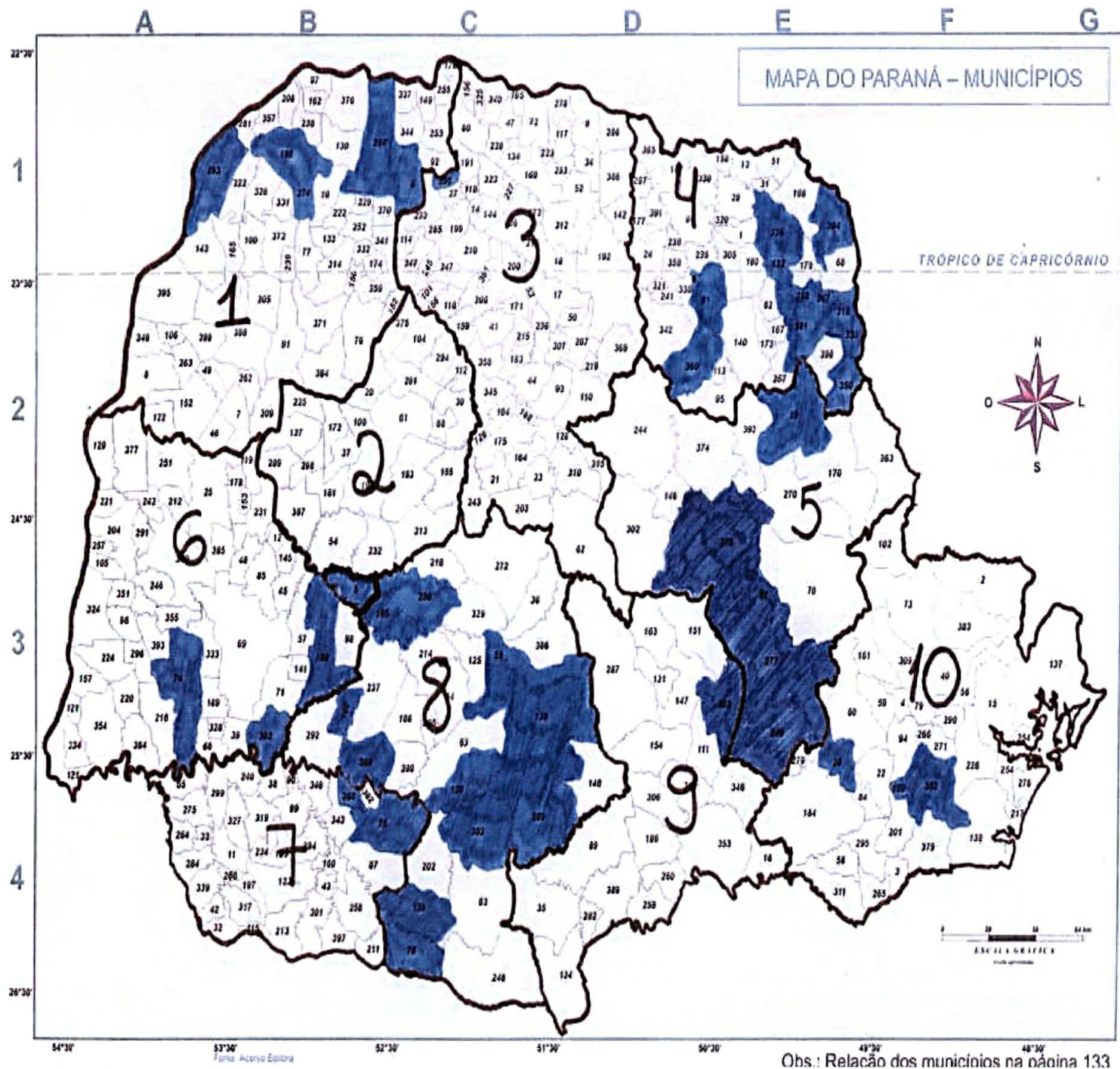
Totalizando 193 amostras fecais bovinas. Os rebanhos analisados foram oriundos de todas as regiões do estado como demonstra a TABELA 9.

TABELA 9 - PROCEDÊNCIA REGIONAL DOS ANIMAIS E FREQUÊNCIA DE CEPAS STEC

Região do Paraná	Total de Amostras	Citotoxicidade Positiva	PCR Positiva
Noroeste	24	16	16
Centro Ocidental	1	1	1
Norte Central	2	0	0
Norte Pioneiro	35	13	16
Centro Ocidental	64	6	14
Oeste	6	2	4
Sudoeste	8	2	2
Centro Sul	37	23	25
Sudeste	1	0	0
Metrop. de Curitiba	15	3	3
Total	193	66	81

O número de amostras abrangeu 43 municípios distribuídos no mapa geográfico da FIGURA 8.

FIGURA 8 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO OS MUNICÍPIOS ANALISADOS QUANTO A PRESENÇA DE STEC NO REBANHO BOVINO.



- Regiões do Paraná
- 1- Noroeste
 - 2- Centro Ocidental
 - 3- Norte Central
 - 4- Norte Pioneiro
 - 5- Centro Ocidental
 - 6- Oeste
 - 7- Sudoeste
 - 8- Centro Sul
 - 9- Sudeste
 - 10- Metrop. de Curitiba

6 DISCUSSÃO

6.1 Pesquisa de STEC O157:H7 em Ágar MacConkey sorbitol (SMAC)

No presente estudo, empregando o Ágar SMAC como método de triagem, não obteve-se isolamento de cepas de *Escherichia coli* O157:H7. A ausência de cepas STEC O157 na amostragem fecal (193) poderia em parte ser atribuída a baixa sensibilidade do método admitida por PATON e PATON, 1998. O uso do SMAC (Ágar MacConkey sorbitol) é largamente difundido por ser um ensaio barato e por propiciar a análise direta das colônias suspeitas de STEC O157 com antisoro O157 (STROCKBINE *et al.*, 1998; NATARO e KAPER, 1998). Porém a sensibilidade do SMAC é limitada para reconhecer as colônias não fermentadoras do sorbitol existentes em relação à microbiota de fundo. Além disso, as cepas de O157 geralmente estão presentes em frequência menor que 1% em relação a microbiota (PATON e PATON, 1998). Entretanto, Silva, (2002) neste mesmo estado isolou apenas uma cepa de STEC O157:H7 em 105 amostras fecais bovinas demonstrando assim a baixa frequência deste sorotipo nas fezes dos animais deste estado. CERQUEIRA *et al.*, (1999) estudando a frequência de cepas STEC em fezes bovinas do rebanho do Rio de Janeiro, isolaram 3 (1,5%) pertencentes ao sorotipo O157 em 197 amostras de portadores do sorotipo O157:H7. Estes dados analisados em conjunto apontam uma baixa incidência de cepas de STEC do sorogrupo O157 no país. Assim, o risco de infecção humana devido a este sorotipo específico de STEC no país parece ser baixo.

Em outros países a frequência de cepas STEC O157:H7 apresenta variação. Na Argentina, BLANCO *et al.*, (2003) caracterizaram 108 cepas de STEC isoladas de fezes bovinas, sendo que 3,7% pertenciam ao sorotipo O157:H7. Por outro lado, GIOFFRÉ *et al.*, (2002) ao analisarem 160 amostras fecais de bovinos oriundos do mesmo país isolaram 8 (5%) cepas de STEC mas nenhuma pertencente ao sorotipo O157:H7.

ERIKSSON *et al.*, (2003) ao pesquisarem a prevalência do sorotipo O157 em bovinos levados ao abate na Suécia, encontraram positividade de 1,7% dentre 2000 animais. HEUVELINK *et al.*, (2003) estudando bovinos oriundos de

abatedouros holandeses isolaram (19/283) 6,7% de STEC O157 em bovinos adultos e (11/321) 3,4% nos vitelos.

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que a incidência do sorotipo O157:H7 é raro nesta e noutras regiões do país haja vista os resultados obtidos nos trabalhos citados realizados no Brasil. Situação diferente do que ocorre nos Estados Unidos onde este sorotipo de STEC é o predominante frente as cepas STEC não-O157.

6.2 Pesquisa de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC)

Utilizando o ensaio de citotoxicidade em células Vero, entre as 193 amostras fecais analisadas foram identificadas 66 (34%) cepas de STEC (FIGURA 3, pag. 48). Trabalho realizado por FARAH *et al.*, (2003) no estado do Paraná em 107 amostras fecais bovinas demonstraram que 59 delas (55%) mostraram-se positivas para produção de toxina Shiga, corroborando com os resultados do presente estudo. CERQUEIRA *et al.*, (1999) ao analisarem 197 amostras fecais bovinas oriundas de animais do estado do Rio de Janeiro, detectaram a ocorrência de STEC em 136 (71%) dos 197 animais estudados. Por outro lado IRINO *et al.*, (2003), em São Paulo, entre 153 amostras fecais bovinas analisadas 25,5% delas apresentaram efeito citotóxico utilizando o ensaio de citotoxicidade em célula como triagem. A diferença na frequência encontrada entre trabalhos, pode ser decorrente de fatores como a diferente procedência geográfica dos animais analisados bem como pelo método empregado para triagem. Estes resultados indicam uma elevada ocorrência de cepas STEC não O157 em vários pontos do país, como também foi encontrado no presente trabalho, o que torna os procedimentos realizados na linha de abate de animais bem como na produção de produtos cárneos objeto de preocupação constante.

Na Alemanha, o ensaio de citotoxicidade apontou que 10,8% dos bovinos saudáveis são portadores de STEC. Foram encontradas apenas 2 cepas do sorotipo O157:H7, mas foram isolados 40% de cepas STEC não-O157 comprovadamente patogênicas ao homem (REIMANN & CLIVER, 1998).

6.3 Detecção de genes *stx* por PCR.

Obteve-se por PCR para detecção dos genes *stx* das 193 amostras 81 (42%) delas apresentaram bandas de amplificação do tamanho esperado (FIGURA 4, pag.49).

Embora o ensaio de citotoxicidade seja considerado um meio efetivo para demonstrar a presença da toxina, os materiais utilizados encarecem a técnica. Além disso, o diagnóstico rápido é importante principalmente em casos de surto, e o resultado deste teste não está disponível em menos de 48 a 72 horas (PATON e PATON, 1998).

Algumas estirpes de STEC produzem altos níveis de toxina e são facilmente detectados mesmo em baixo número. Porém, a presença de outras substâncias podem vir a alterar o resultado, sendo necessário a sua confirmação por meio de outros testes (SMITH e SCOTLAND, 1988).

Apesar deste método diagnóstico ser considerado de grande valia na detecção da toxina Shiga, a utilização de tempo e mão de obra é intensa, sendo muitas vezes inviável para muitos laboratórios de microbiologia (NATARO e KAPER, 1998).

No trabalho de CERQUEIRA *et al.*, (1999) que realizaram a triagem por PCR de 197 amostras bovinas oriundas do estado do Rio de Janeiro 71% (139/197) apresentaram positividade, indicando alta ocorrência de cepas STEC.

Na Austrália foram avaliadas 123 amostras fecais de bovinos e destas 23 (18,7%) foram positivas para STEC por PCR. Os sorotipos isolados incluíram O5:H-, O26:H-, O26:H11, O91:H21, O111:H-, O111:H8, O104:H11, O113:H21 e O157:H8, comprovando que bovinos carregam STEC associadas com doenças humanas (HORNITZKY *et al.*, 2001).

Na Tailândia RASMUSSEN *et al.*, (1993) estudando o conteúdo ruminal como reservatório de cepas STEC, utilizando a metodologia de PCR, verificaram que os 50% dos bovinos no abatedouro apresentaram positividade. Comparativamente 18% dos mesmos animais foram positivos quando amostrados ainda na fazenda.

Na Índia a análise por PCR, utilizando material fecal de bovinos saudáveis, indicou que 18% das amostras eram positivas para *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (KHAN *et al.*, 2002).

Estes estudos mostram uma ampla variação na frequência de cepas STEC nos rebanhos. Devido à excreção intermitente e devido a dificuldade de isolamento deste patógeno, a verdadeira prevalência da STEC no reservatório é provavelmente maior do que alguns estudos sugerem (WHO, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) representa uma importante ferramenta em levantamentos epidemiológicos, devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez. O uso da PCR permite a detecção do gene *stx* de amostras contendo microrganismos viáveis e não viáveis (NATARO e KAPER, 1998). Esta metodologia possibilita a amplificação de uma fração mínima do produto em curto espaço de tempo sem isolamento prévio do agente (POLLARD *et al.*, 1990; BASTIAN *et al.*, 1998).

O fatores limitantes desta técnica são a presença de inibidores da enzima *Taq* DNA polimerase presentes na própria amostra e a facilidade de contaminação durante o processo (BRIAN *et al.*, 1992). Além disso, a seqüência a ser escolhida para o iniciador (primer) deve ser uma região bastante conservada para que não ocorra a diminuição na eficiência do anelamento, não diminuindo assim a sensibilidade da reação (PATON e PATON, 1998).

6.4 ESTUDO COMPARATIVO DA PCR EM RELAÇÃO AO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

Os resultados apontam uma maior sensibilidade para a técnica da PCR como referem os resultados obtidos no item 5.6 (pag.52). Os valores de sensibilidade e especificidade foram 97% e 87%, respectivamente. Das 66 amostras que apresentaram atividade citotóxica para células Vero, 2 não apresentaram bandas de amplificação por PCR. Este achado pode sugerir a presença de inibidores da *Taq* DNA polimerase naquelas amostras, ou formas variantes que não sejam reconhecidas pelos iniciadores utilizados. Em 81 amostras a presença de genes *stx* foi detectada por PCR (FIGURA 5) mas 17 não foram detectadas alterações no ensaio de citotoxicidade o que sugere que a STEC não estava presente. Entretanto a STEC pode expressar a toxina Shiga em níveis muito baixos que não seriam detectados no ensaio de citotoxicidade (SMITH e SCOTLAND, 1988), mas a

presença dos genes *stx* ainda seria detectada por meio da PCR. Os resultados obtidos sugerem que a PCR é mais sensível na detecção de STEC.

6.5 FREQUÊNCIA DE CEPAS STEC NOS MESES DO ANO COM TEMPERATURA MÉDIA DE 21°C E 13°C

No presente estudo foi avaliada a ocorrência de cepas STEC durante o ano. Quando a frequência de isolamento de cepas STEC durante os meses com temperatura média de 21°C (dez/2002 a maio/2003 e nov/2003) foi comparada aquela obtida nos meses com temperatura média de 13°C (jun a set de 2003). O valor obtido do $X^2 = 1,71$ quando $p=0,1910$ (FIGURA 7, pag.54) indica que não há diferença significativa na frequência de cepas STEC nos dois períodos. Em nosso país não existem estudos relatando esta informação razão pela qual foi analisada esta variante. O fato de não ocorrer invernos tão rigorosos na região estudada como ocorre no Hemisfério Norte pode justificar o resultado encontrado.

COHEN (1996) relata o isolamento de cepas STEC ao longo de todo o ano, embora casos mais frequentes ocorram nos meses quentes. Esta informação é similar ao que ocorre nos humanos em muitos países (NIELSEN *et al.*, 2002). Estudo realizado na Luisiana (EUA) enfocando o sorotipo O157:H7, relata uma sazonalidade bem definida durante a primavera e o verão aumenta não só o isolamento de cepa STEC em amostras fecais como no ambiente e nos alimentos (DUNN, 2003).

6.6 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE CEPAS STEC EM FEZES DE ANIMAIS JOVENS E ADULTOS.

Neste trabalho uma positividade de 34% foi detectada no ensaio de citotoxicidade em células Vero e 42% na PCR. Quando as populações de animais adultos e bezerros são analisadas separadamente, observa-se uma positividade de 46,5% (ensaio de citotoxicidade) (TABELA 7) e 51% (PCR) (TABELA 8, pag 51) para os adultos, níveis estes similares aos descritos por FARAH (2003), enquanto que a PCR indica uma frequência de 17,6% nos bezerros. No ensaio de citotoxicidade em células Vero nenhuma STEC foi encontrada nos animais jovens (TABELA 7). Embora tenha ocorrido uma variação entre as duas metodologias, a maior

positividade ocorreu entre os animais adultos. Estes resultados estão dentro do intervalo descrito para freqüência de STEC em bezerros descrito na literatura. EDRINGTON *et al.*, (2003) ao pesquisarem STEC O157:H7 em mais de 1000 rebanhos leiteiros nos Estados Unidos, obtiveram freqüências variando de 1% até 56%. Os animais lactantes apresentaram maior positividade (66%) do que os não lactantes (34%). No entanto LEOMIL *et al.*, (2003) realizaram um estudo com 344 amostras fecais de bezerros, utilizando a PCR. A positividade encontrada foi de 12,7% para STEC, níveis similares aos encontrados neste trabalho.

A população estudada no presente trabalho é oriunda de 43 municípios do estado, regiões heterogêneas quanto a ecologia, práticas de manejo e dieta do rebanho. Destaca-se a alta freqüência de cepas STEC, proporcionalmente às amostras obtidas nas regiões Centro Sul e Noroeste. Nestes locais predominam o tipo de criação extensiva em relação ao confinamento dos animais.

Existem muitas lacunas no conhecimento das cepas STEC no ambiente intestinal do bovino. Vários experimentos e considerações teóricas devem ser realizados, para que se consiga elucidar os aspectos epidemiológicos sobre este reservatório.

7 CONCLUSÕES

- Cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) do sorotipo O157:H7 não foram encontrados nas fezes bovinas do rebanho paranaense analisado.
- Foi encontrada alta frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), sendo 34% no ensaio de citotoxicidade em células Vero e 42% por PCR, nas amostras fecais analisadas de bovinos no estado do Paraná.
- O ensaio de PCR detectou maior número de STEC em relação ao teste de citotoxicidade (81 amostras positivas na PCR e 66 no ensaio de citotoxicidade).
- Não houve diferença na frequência de isolamento de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) entre os períodos com temperatura média de 13°C e 21°C ao longo do ano.

REFERÊNCIAS

ANSAY,S.E.; KASPAR,C.W. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for O157:H7. **Letters In Applied Microbiology**, Oxford, v.25, p.131-134, 1997.

ARMSTRONG,G.L.; HOLLINGSWORTH,J.; MORRIS, J.G., Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 29-51, 1996.

BASTIAN,S.; CARLE,I.; GRIMONT,F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Research In Microbiology**, Paris, v.149, p.457-472, 1998.

BEERY, J.T., DOYLE, M.P. SCHOENI, J.L. Colonisation of chicken cecal by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 310-315, 1985.

BELL, C., Approach to the control of entero-hemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.78, p.197-216, Brussels, 2002.

BELONGIA,E.A.; OSTERHOLM,M.T.; SOLER,J.T. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minesota child day-care facilities. **Jama**, Chicago, v.269, p.883-888, 1993.

BERGEY'S Manual of systematic bacteriology. 9 ed. Baltimore: Williams & Wikins, 1984. p. 408. BETTELHEIM, K. A. Commemoration of the Publication 100 Years ago of the Papers by Dr. Th. Escherich in which are Described for the First Time the Organisms that Bear his Name. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Hygiene**, Stuttgart, v. 261, p. 255-265, 1986.

BETTELHEIM, K. A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* : A new problem, na old group of organisms. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.73, n.1, p.20-26, 1996.

BLANCO,J.E.; BLANCO,M.; SANZ,M.E.; KRUGER,A.; MORA,A.; DAHBI,G.; LUCCHESI,P.M. Serotypes and Virulence Genes (*Vt1, Vt2, Eae, Ehxa, Saa*) of VTEC Isolated From Cattle and Humans in Argentina In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN', 5th, 2003, Edinburgh. **Anais** (Edinburgh:5th), 2003. P.196.

BOERLIN,L.; ZIMMERMANN,S. GLEIER,K. Human Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Other than Serogroup O157 in Germany. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.4, n.4, p.635-639, 1998.

BONARDI,S.; MAGGI,E.; BOTTARELLI,A.; PACCIARINI,M.L.; ANSUINI,A.; VELLINI,G.; MORABITO,S. CAPRIOLO,A. Isolation of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.67, p.203-211,1999.

BORTOLINI, M.R. **Infecções intestinais bacterianas**: importância, agentes etiológicos e diagnóstico laboratorial. Curitiba, 1995. Monografia (Especialização em Bacteriologia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BRESS,I.M.P.; MORGAN,T.W.; ACKERMANN,M.R.; NYSTROM,E.D.; SAMUEL,J.E.; CORNICK,N.A.; MOON,H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **PNAS**, v.97, n.19, p.10325-10329, 2000.

BRIAN,M.J.; FROSOLONO,M.; MURRAY,B.E.; MIRANDA,E.L.; LOPEZ,E.L.; GOMEZ,H.F.; CLEARLY,T.G. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, p.1801-1806, 1992.

BROOKS,H.J.L.; MOLLISON,B.D.; BETTELHEIM,K.A.; MATEJKA,K.; PATERSON,K.A.; WARD,V.K. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.31, p.118-121, 2001.

BUMA,R.; MAEDA,T.; MARUTAKA,Y.; SANADA,H.; KAMEI,M.; NAGAMUNE,H.; KOURAI,H. Characterization of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* isolated from housefly (*Musca Domestica*) and its Possibility of Transmission by Housefly., 4th, 2000, Kyoto. **Anais** (Kyoto:4th), 2000. P.150.

BÜRK,C.; DIETRICH,R.; AÇAR,G.; MORAVEK,M.; BÜLTE,M.; MÄRTLBAUER,E. Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of Bovine Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.5, p. 2106-2112, 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. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p.266-270,2000.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 38-47

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. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.70, p.111-121, 1999.

CERQUEIRA, A.M.F.; ***Escherichia coli* produtora de toxina Shiga**: prevalência no reservatório animal, marcadores de virulência e análise da estrutura clonal. São Paulo, 2000. 135f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

CHAPMAN, P.A. Evaluation of commercial látex slide test for identifying *Escherichia coli* O157. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 42, p. 1109-1110, 1989.

CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A.; ZADIK, P.M.; JEWES, L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.35, p.107-110, 1991.

CIGOLINI, A.; LOPES, N. **Paraná: Quadro Natural, Transformações Territoriais e Economia**. 2 ed. São Paulo: Saraiva, 2001.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P. Horizontal Transmission of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* within Groups of Dairy Calves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4148-4152, 2002.

COHEN, M. B. *Escherichia coli* O157:H7 infections: A frequent cause of bloody diarrhea and the hemolytic: urêmic syndrome. **Advances in Pediatrics**, Chicago, v. 43, 1996.

CRAY JR, W.C.; MOON, H.C.; Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1586-1590, 1995.

CRAY JR, W.C.; CASEY, T.A.; BOSWORTH, B.T.; RASMUSSEN, M.A. Effect of Dietary Stress on Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Calves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.5, p.1975-1979, 1998.

CUBBON, M.D.; COIA, J.E.; HANSON, M.F. A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in human faeces. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.44, p. 219-222, 1996.

DE GRAAF, F.K. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, Berlin, v.151, p.29-53, 1990.

Diagnóstico de *Escherichia coli* produtor de toxina Shiga: Manual de Procedimentos. Ministério de Salud da Argentina, Buenos Aires, 2000.

DYNAL(b). **Testing food sample for *Escherichia coli* O157:H7 - IMS vs direct plating**. Oslo: DYNAL, 1996.

DOYLE, M.; PADHYE, V., *Escherichia coli* p. 236-282, 1989. In M. DOYLE (ed). *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker. Inc., New York, NY.

DUFFY,G.; GARVEY,P.; WASTESON,Y; COIA,J.E.; MC DOWELL,D.A. (Ed.). *Epidemiology of verotoxigenic E. coli*. Dublin: The National Food Center, 2001
Disponível em: <<http://www.research.teagasc.ie/vteceurope/epitechbook.htm>>
Acesso em: 01 nov. 2003.

DUNN,J.R. **The Epidemiology of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Louisiana Dairy Cattle, Beef Cattle and White-Tailed Deer**. Louisiana, 2003. 181f.
Dissertação (Graduação em Agricultura) Departamento de Ciências Veterinárias.
Universidade do Estado da Louisiana.

EDRINGTON,T.S.; CALLAWAY,T.R.; LOOPER,M.L.; ELDER,R.O.; GENOVESE,K.J.; BISCHOFF,K.M.; ANDERSON,R.C.; NISBET,D.J. *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Cattle: Anti-Microbial Susceptibility And Factors Affecting Shedding. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN', 5th, 2003, Edinburgh. **Anais** (Edinburgh:5th), 2003. P.209.

EKLUND,M.; KIRSIKKA,L; SIITONEN,A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.12, p.4585-4593, 2002.

ELDER,R.O.; KEEN,J.E.; SIRAGUSA,G.R.; BARKOCY-GALLAGHER,G.A., KOOHMARAIE,M.; LAEGREID,W.W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **PNAS**, v.97, n.7, p.2999-3003, 2000.

EVANS, J.D.J.; EVANS, D.J.; DUPONT,H.L. Paterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: suggestive evidence for na interrelationship with serotype. **Infectious Immunology**, Oxford, v. 17, p. 105, 1977.

EWING,W.H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobactériaceae**. 4 ed. Nem York: Elsevier Science, 1986.

FARAH, S.M.S.S.; SILVA, L.R.; CASTILHOS, L.; KATO, M.A.M.F.; RAMOS, I.; VAZ,T.M.I.; IRINO,K. Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef Cattle Paraná, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN', 5th, 2003, Edinburgh. **Anais** (Edinburgh:5th), 2003. P.212.

FENG,P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.1, n.2, p. 1-9, 1996.

FORBES,B.A.; SAHM,D.F.; WEISSFELD,A.S. **Diagnostic Microbiology**. 10ed. Nova York: Mosby, 1998.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Curso de diagnóstico laboratorial de agentes patogênicos de doenças veiculadas por alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2000.

FUKUSHIMA,H.; GOMYODA,M. An Effective, Rapid and Simple Method for Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from Faeces and Food Samples. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Berlin, v. 289, p.415-428, 1999.

GIOFFRÉ,A.; MEICHTRI,L.; MILIWEBSKY,E. BASCHKIER,A.; CHILLEMI,G.; ROMANO.M.I.; ESTANI,S.S.; CATALDI,A.; RODRÍGUEZ,R.; RIVAS,M. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina Evaluation of two procedures. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p.301-313, 2002.

GIRALDI,R.; GUTH,B.E.C.; TRABULSI,L.R. Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, p.1460-1462, 1990.

GYLES, C.L.; ***Escherichia coli* in domestic animals and humans.** Wallingford: Cab International, 1994.

GOMES,T.A.T.; RASSI,V.; GRIFFIN,P.M.; GUTH,B.E.; RAMOS,S.R.T.S. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de citotoxinas em crianças com diarreia aguda em São Paulo, p.137. In: **XVI Congresso Brasileiro de Microbiologia.** Santos, SP, Brasil, 1991.

GONZALEZ,F.D.; CALLAWAY,T.R.; KIZOULIS,M.G.; RUSSELL.J.B. Grain Feeding and the Dissemination of Acid-Resistance *Escherichia coli* from Cattle. **Science**, Oxford, v.11, n.5383, p.1666-1668, 1998.

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

GUTH,B.E.C.; GIRALDI,R.; GOMES,T.A.T.; MARQUES,L.R.M. Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC adherence factor (EAF) sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.341-344, 1994.

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 *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p.1085-1089, 2002.

HACKER, J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 720-727, 1992.

HANCOCK,D.D.; BESSER,T.E.; RICE,D.H. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle and Impact of Management Practices. In: KAPER,J.B.; O'BRIEN,A.D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. P. 85-91.

HART,C.A.; TREES,A.J.; DUERDEN,I. Zoonoses. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.46, p.4-33, 1997.

HEUVELINK,A.E.; ROESSINK,G.L.; BOSBOOM,K.; De Boer,E. Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam,v.66, p.13-20, 2001.

HORNITZKY,M.A.; BETTELHEIM,K.A.; DJORDJEVIC,S.P. The detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diagnostic bovine fecal samples using vancomycin-cefixime-cefsulodim blood agar and PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.198, n.1, p.17-22, 2001.

INFORME-NET DTA Manual das doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ecolinet.htm>> . Acesso em: 1/8/2002.

IRINO,K.; KATO, M.A.M.F.; SOUZA,M.A.C.; CRUZ,A.S.; GOMES,T.A.T.; VIEIRA,M.; GUTH,B.E.C. Serotypes and Virulence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN', 5th, 2003, Edinburgh. **Anais** (Edinburgh:5th), 2003. P. 239.

JANN,B.; JANN,K. Serology chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.41, p. 667-710, 1977.

KARMALI,M.A.; PETRIC,M.; LIM,C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **The Lancet**, London, v.1, n. 8325, p. 619-620, 1983.

KARMALI,M.A.; PETRIC,M.; LIM,C.; CHEUNG,R.; ARBUS,G.S. Sensitive method for detecting low numbers of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of Verotoxin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington,v.22, p.614619, 1985.

KAPER,J.B.; ELLIOT,S.; SPERANDIO,V.; PERNA,N.T.; MAYTHEW,G.F.; BLATTNER,F.R. Attaching-and-effacing intestinal histopatology and the locus of enterocyte effacement. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 163-182.

KAUFFMANN,F. Zur serologie der *coli*-gruppe. **Apmis : Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica . Supplementum**, Copenhagen, v.21, p.20-45, 1944.

KHAN,A.; YAMASAKI,S.; SATO,T.; RAMAMURTHY,T.; PAL,A.; DATTA,S.; CHOWDHURY,N.R.; DAS,S.C.SIKDAR,A.; TSUKAMOTO,T.; BHATTACHARYA,S.K.; TAKEDA,Y.; NAIR,G.B. Prevalence and Genetic Profiling of Virulents Determinants Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Beef, and Humans, Calcutta, India. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, n.1, 54-62, 2002.

KONEMAN,E.W.; ALLEN,S.D.; JANDA,W.M.; SCHRECKENBERGER,P.C.; WINN,W.C. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

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

LEOMIL,L.; AIDAR-UGRINOVICH,L.; GUTH,BE.C.; IRINO,K.; VETTORATO,M.P.; ONUMA,D.L.; CASTRO,A.F.P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brasil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.97, p.103-109, 2003.

LEUNG,P.H.M.; PEIRIS,J.S.M.; NG,W.W.S.; ROBINS-BROWNE,R.M.; BETTELHEIM,K.A., YAM,W.C. A Newly Discovered Verotoxin Variant VT2g, Produced by Bovine Verotoxigenic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.12, p.7549-7553, 2003.

LEW, J.F.; LEBARON,C.W.; GLASS,R.I.; TOROK,T.;GRIFFIN,P.M.; WELLS,J.G.; JURANEK,D.D.; WAHLQUIST,S.P. Recomendations for Collection of Laboratory Specimens Associated with Outbreaks of Gastroenteritis. **MMWR**, v39, n. RR-14, p.1-13, 1990. Disponivel: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001829.htm>>. Acesso: 12 set. 2003.

LIOR,H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES,C.L. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: Cab International, 1994. P.31-72.

LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; DE ROSA, M. F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in South América. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 30-37.

LIU,Y.; LI,Y.; Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.1673, p.1-9, 2002.

Manual de Procedimiento Diagnóstico de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga – Ministério de Salud da Argentina, 2000.

MELTON-CELSA,A.R. e O'BRIEN,A.D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: KAPER,J.B. e O'BRIEN,A.D. (Editors). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C., pp. 121-128, 1998.

MENG,J.; ZHAO,S.; DOYLE,M.P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **International Journal Of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 45, p.229-235, 1998.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; NAKAYAMA, T.; EJIMA, Y.; HIROE, K.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; USAMI, S.; YONEKAWA, M.; SADAMOTO, K.; TAKAYA, S.; SAKAI, N. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli Strains**. Washington, D.C.: ASM, 1998. p. 73-81.

MYAO,Y.; KATAOKA,T.; NOMOTO,T.; KAI,A.; ITOH,T.; ITOH,K. Prevalence of verotoxin –producing *Escherichia coli* harbored in the intestine of cattle in Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.137-143, 1998.

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

NIELSEN,E.M.; TEGTMEIER,C.; ANDERSEN,H.J.; GRONBEAK,C.; ANDERSEN, J.S. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish Dairy farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.88, p.245-257, 2002.

OLSVIK,O. STROCKBINE,N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING,D.H.; SMITH,T.F.; TENOVER,F.C.; WHITE,T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington: ASM. 1993. P.271-276.

ORSKOV,F.; ORSKOV,I.; GIORGI,W. Mannose-resistant haemoagglutination and colonization factors among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Research**, Amsterdam, v.109, p.275-278, 1981.

ORSKOV, I ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 95, p. 551-575, 1985.

PADOLA,N.L.; SANZ,M.E.; BLANCO,J.E.; BLANCO,M.; BLANCO,J.; ETCHEVERRIA,A.I.; ARROYO,G.H.; USERA,M.A.; PARMA,A.E. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.26, p. 2564-2572, 2003.

PARK, S.; WAROBO, R. W.; DURST, R. A. *Escherichia coli* O157:H7 as an **engerging foodborne pathogen: a literature review**. Critical reviews in food science and nutrition, 1999

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, n.3, p.450-479, 1998.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n.11, p.6999-7009, 2001.

POLLARD, D.R.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K.R. Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, n.3, p.540-545, 1992.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Enterobacteriaceae*. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. [S.l.]: Wolf Publishing. 1994. P. 209-236.

RASMUSSEN, M.A.; CRAY JR, W.C.; CASEY, T.A.; WHIPP, S.C. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.114, p.79-84, 1993.

REIMANN, H.P.R.; CLIVER, D.O. *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v.14, n.1, 1998.

RIBEIRO, M.G.; PINTO, J.P.A.N.; SILVA, E.O.T.R. *Escherichia coli* O157:H7 De Hambúrguer, Leite e Outros Gêneros Alimentícios à Colite Hemorrágica e Síndrome Urêmico-Hemolítica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.66/67, 1999.

RICHTER, H.; TIMM, M.; LEHMANN, S.; LOCHOTZKE, H.; PERLBERG, K.; FEIER, U.; PROTZ, D. Influence of different feed rations on *E. coli* and VTEC in faeces of a cattle, 4th, 2000, Kyoto. **Anais (Kyoto:4th)**, 2000. P.150.

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

ROBERT, P.H.; DAVIS, K.C.; GARSTKA, W.R.; BHUNIA, A.K. Lactate dehydrogenase release assay from Vero cells to distinguish verotoxin producing *Escherichia coli* from non-verotoxin producing strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.43, p.171-181, 2001.

ROBINS-BROWNE, R. M.; ELLIOTT, E.; DESMARCHELIER, P. Shiga toxin - Producing *Escherichia coli* in Australia. In: ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 66-72.

ROSENSHINE, I.; RUSCHKOWSKI, S.; STEIN, M.; REINSCHED, D.; MILLS, S. D.; FINLAY, B. B. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. **EMBO Journal**, Oxford, v.13, p. 2613-2624, 1996.

SAMBROK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A laboratory manual**. 2 ed. New York: CSH. 1989.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L. H.; KARCH, H. Anem Shiga Toxin Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1205-1208, 2000.

SILVA, L. R., **Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos abatidos em matadouro frigorífico de Curitiba – Paraná**. Curitiba, 2002. 144f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Paraná.

SMITH, H. R.; SCOTLAND, S. M. Vero cytotoxin-producing strains. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.26, p.77-85, 1988.

SOJKA, W. J. Enteric diseases in new-born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal v.41, p.509-522, 1971.

SPIKA, J. S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P.; MILLEY, D.; WILSON, J.; WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canadá. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 23-29.

STROCKBINE, N. A.; WELLS, J. G.; BOPP, C. A.; BARRET, T. J. Overview of detection and subtyping methods. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 331-356.

SWERDLOW, D. L.; WOODRUFF, B. A.; BRADY, R. C.; GRIFFIN, P. M.; TIPPEN, S.; DONNELL JR, H. D.; GELDREICH, E.; PAYNE, B. J.; MEYER JR, A.; WELLS, J. G. A Waterborne Outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia v.15, p. 812-819, 1992.

TAKEDA, Y. Bacteriological detection methods of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Nippon Rinsho**, Tokyo, v.55, n.3, p. 651-654, 1997.

TAUXE, R. V. Emerging food borne diseases: an evolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 4, p. 425-434, 1997.

VARNAM, A. H. Consultant Microbiologist Southern Biological Reading. **Food borne pathogens an illustrated text**. Mosby Year Book, 1991

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; GOMES, T.A.T.; NOVELLA, M.C.; CHINARELLI, S.H.; ROCHA, M.M.M. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Human Infections In São Paulo, Brazil, From 2000 to 2002. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN', 5th, 2003, Edinburgh. **Anais** (Edinburgh:5th), 2003. P.226.

VIEGAS, C.V. **Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em carne bovina crua comercializada em Porto Alegre**. Porto Alegre: UFRGS. Fac. Agronomia, 1996. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

WANG, G.; DOYLE, M.P. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Water. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.662-667, 1998.

WIELER, L.H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRUCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Bovines: Association of Adhesion with Carriage of *eae* and Other Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 2980-2985, 1996.

WIELER, L.H. Is it possible to control STEC O157 and other STEC in food animals?. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON 'SHIGA TOXIN (VEROTOXIN) – PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* INFECTIONS', 4th, 2000, Kyoto. **Anais** (Kyoto:4th), 2000. P.3-2.

WHO/CSR/APH/98.8. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany 23-26 June 1998. **World Health Organization**. WHO/FSF/FOS/97.6. 1998.

ZADIK, P.M.; CHAPMAN, P.A.; SIDONS, C.A. Use of Tellurite for the Selection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.39, p.155-158, 1993.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; BESSER, R.E. Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with or without preservatives. **Applied of Environmental Microbiology**, Washington, v.8, n.58, p.2526-2530, 1993.

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

1.1 Meio de Transporte Cary Blair

Descrição: Cary Blair Transport Medium

Embalagem: 500g

Marca: Difco

Fórmula	g/litro
• Fosfato dissódico	1,1
• Tioglicolato de sódio	1,5
• Cloreto de sódio	5,0
• Cloreto de cálcio	0,09
• Ágar	5,6
• Água destilada	1 litro

pH: 8,4

Obs. Meio comprado já pronto para uso.

1.2 Ágar MacConkey-sorbitol (SMAC)

Descrição: MacConkey Sorbitol Agar

Embalagem: 500g

Marca: Difco

Fórmula	g/litro
• Peptona	20,0
• Sorbitol	10,0
• Sais Biliares nº3	1,5
• Cloreto de Sódio	5,0
• Vermelho Neutro	0,03
• Cristal Violeta	0,001
• Ágar	15,0

pH: 7,1

Preparo: Foram dissolvidas 50 gramas do meio MacConkey sorbitol desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,1 e esterilizava-se em autoclavava-se a 121°C durante 15 minutos. O meio foi resfriado até temperatura de 45°C e distribuído volumes de aproximadamente 12 ml em placas de Petri de 15 X 100mm. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.3 Meio de Rugai Modificado ou E.P.M.

Descrição: E.P.M. ou Meio de Rugai Modificado

Embalagem: 500g

Marca: Difco

Solução "A"

Fórmula	g/litro
• Triptona	10,0
• Extrato de carne	2,0
• Cloreto de sódio	5,0
• Fosfato de sódio dibásico	2,0
• L-triptofano	1,0
• Solução alcoólica de azul de bromotimol	2 ml
• Ágar	11,0
• Água destilada	1000 ml

Solução "B"

Fórmula	g/litro
• Citrato de ferro amoniacal	2,0
• Tiosulfato de sódio	2,0
• Glicose	10,0
• Uréia	40,0
• Água destilada	85 ml

Preparo: Foram realizadas a dissolução dos meios. Ajustava-se o pH 7,0 e misturava-se 1000ml da **Solução "A"** + 17,5 ml da **Solução "B"**. Distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 X 100mm. Formava-se uma superfície inclinada.

1.4 MILI

Descrição: MILLI
 Embalagem: 500g
 Marca: Difco

Fórmula	g/litro
• Extrato de levedura	3,0
• Peptona	10,0
• Triptona	10,0
• L-lisina	10,0
• Glicose	1,0
• Ágar	2,0
• Bromo cresol púrpura	0,02
• Água destilada	1000 ml

pH= 6,5

Obs. Meio comprado pronto para o uso.

1.5 Ágar TSA

Fórmula	g/litro
• Extrato de carne	3,0
• Peptona	5,0
• Cloreto de Sódio	8,0
• Ágar	15,0
• Água destilada	1000 ml

1.6 Reativo de Kovacs

Fórmula

• <i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído	2,0 g
• ácido clorídrico concentrado	40,0 ml
• álcool etílico absoluto	190,0 ml

1.7 Solução Fisiológica para suspensões bacterianas

Cloreto de Sódio (NaCl)	10 g
Água destilada	100 ml

1.8 Provas Complementares

1.8.1 Meio De Base Moeller

A. Caldo Base de Moeller para Descarboxilase

Fórmula	g/litro
• Peptona	5,0
• Extrato de carne	5,0
• Púrpura de bromocresol	0,01
• Vermelho de cresol	0,005
• Glicose	0,5
• Piridoxal	0,005
• Água destilada	1000 ml

pH=6,0

B. Aminoácidos

Adicionar 10g (concentração final 1%) da forma 1 levogiro do aminoácido (lisina, ornitina ou arginina).

1.8.2 Meio de Ágar Citrato

Fórmula	g/litro
• Fosfato diácido de amônia	1,0
• Fosfato dipotássico	1,0
• Cloreto de sódio	5,0
• Citrato de sódio	2,0
• Sulfato de magnésio	0,20
• Ágar	15
• Azul de bromotimol	0,08
• Água destilada q.s.p.	11 ml

pH = 6,9

Preparo: Foram dissolvidas 22 gramas do meio Ágar Citrato desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição. Ajustava-se o pH para 6,9 e distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 X 100mm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio foi distribuído em tubos, solidificado e inclinado.

1.8.3 Água Peptonada com Azul de Bromotimol com Celobiose ou Sorbitol

Fórmula	g/litro
• Peptona	10,0
• Azul de Bromotimol	5,0
• Água destilada	1000ml

Preparo: Dissolver os ingredientes em água. Distribuir 5ml em cada tubo. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Retirar da autoclave e fechar bem os tubos. No momento da realização da prova coloca-se o disco de celobiose ou sorbitol.

1.8.4 Composição Do Caldo Triptofano

Fórmula	g/litro
• Peptona digerida em caseína pancreática	2,0
• Cloreto de Sódio	0,5
• Água destilada	100ml

1.9 Composição do Caldo Penassay

Marca: Difco

Fórmula	g/litro
• Peptona digerida em caseína	4,0
• Gelatina digerida	6,0
• Dextrose	1,0
• Extrato fermentativo	3,0
• Extrato de carne	1,5
• Água destilada	qsp 1000

ANEXO 2 – INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS

2.1 Meio de Rugai modificado ou Meio E.P.M.

O meio de Rugai modificado ou E.P.M. permite a leitura do LTD ou desaminação do L triptofano, evidenciado por meio da cor verde garrafa no ápice do tubo. A leitura da fermentação da glicose é evidenciada pela coloração amarela na base do tubo fruto da acidificação fermentativa. A produção de gás a partir da glicose é analisada observando-se o arrebentamento do meio ou pela presença de bolhas inseridos no Ágar. Já a presença de gás sulfídrico é demonstrada pela coloração negra. A prova da urease positiva apresenta coloração azul fruto da alcalinização provocada pela liberação de amônia (MACFADDIN, 1993).

2.2 Meio MILI

O meio MILI fornece a leitura de três testes conjuntamente. A motilidade flagelar bacteriana, a produção de Indol a partir do aminoácido triptofano e a descarboxilação do aminoácido lisina. A motilidade é observada pela turvação do meio principalmente na linha de semeadura central. O indol é um dos produtos de degradação do metabolismo do aminoácido triptofano, sendo detectado quando ocorre o aparecimento de cor vermelha após a adição do reativo de Kovacs. A descarboxilação da lisina eleva o pH para a alcalinidade evidenciada pela coloração roxa. Nas reações negativas ocorrem a oxidação da glicose que torna o pH ácido com coloração amarelada. (KONEMAN, 2001).

2.3 Provas Complementares

2.3.1 Caldo descarboxilase base Moeller

Esta prova mede a capacidade enzimática de um organismo para descarboxilar o aminoácido em questão (lisina, arginina ou ornitina). Realiza-se uma suspensão da colônia suspeita a partir do ágar TSA, pinga-se três gotas da suspensão em cada um dos tubos de base Moeller com o aminoácido a ser testado e inocula um tubo sem aminoácido como teste. Coloca-se vaselina estéril nos tubos para obter anaerobiose e incuba-se a 36°C por 18 a 24 horas (MOELLER, 1955). A viragem para cor amarela é negativo e a coloração roxa positiva.

2.3.2 Meio Citrato Inclinado

Uma colônia bem isolada do Ágar SMAC é semeada, com uma alça de níquel cromo bem carregada com produto bacteriano, em forma de estria única na superfície inclinada do ágar citrato. Incuba-se a 36°C por 18 a 24 horas. A prova positiva é evidenciada pela cor azul que representa uma reação de alcalinidade, demonstrando que o citrato foi utilizado como única fonte de carbono ou na presença de crescimento das colônias ao longo da estria. A prova negativa é representada ausência de alterações no meio (SIMMONS, 1926).

2.3.3 Meio contendo água peptonada com azul de bromotimol suplementada com celobiose ou com sorbitol.

Coloca-se no meio base um disco de celobiose ou sorbitol. Então realiza uma suspensão da colônia suspeita a partir do Ágar TSA e pinga-se três gotas da suspensão no meio base contendo água peptonada com azul de bromotimol e o disco com o açúcar a ser testado, sela-se com vaselina estéril com objetivo de criar ambiente de anaerobiose. Incuba-se a 36°C por 18 a 24 horas. A coloração amarela significa que houve acidificação fermentativa do ambiente, demonstrando que o carboidrato foi fermentado. Em caso negativo a coloração permaneceu verde.

2.3.4 Caldo Triptofano

Realiza-se uma suspensão da colônia suspeita a partir do Ágar TSA em solução fisiológica e pinga-se três gotas no caldo triptofano. Incuba-se a 36° por 24 horas. Pinga-se reativo de Kovacs. A interpretação da reação do indol positivo, apresenta coloração vermelha.

ANEXO 3 – PREPARAÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO PARA A REALIZAÇÃO DE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.

Baseado no Manual de Procedimiento Diagnóstico de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga – Ministério de Salud da Argentina.

Material

- PBS (solução buffer de fosfato, livre de íons cálcio e magnésio)
- Tripsina 0,25%
- Antibióticos: Gentamicina (50ug/ml), Anfotericina B (fungicida) (5ug/ml)
- Soro fetal bovino
- Meio mínimo essencial com aminoácidos não essenciais e glutamina (marca Sigma)
- Meio de crescimento Eagle com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (marca Sigma)
- Meio de manutenção Eagle com 2% de soro fetal bovino e antibiótico (marca Sigma)
- Pipetas de 5 e 10 ml
- Frascos de 25cm²
- Estufa a 37°C com atmosfera de CO₂
- Álcool 70°

Procedimento de repique

O procedimento de subcultivo realizado na célula consiste na realização da passagem para outro frasco ou também denominado repique. A transferência de um frasco de cultivo para outro objetiva amplificar a linhagem. Nesta etapa é realizado o despreendimento da monocamada de suporte com tripsina e semeia em recipientes de maior superfície.

- Observar ao microscópio o cultivo que se deseja repicar visualizando se a monocamada é contínua e uniforme, com morfologia normal e sem contaminações.
- Descartar o meio.
- Lavar com PBS.
- Cobrir a monocamada com uma quantidade suficiente de solução de tripsina (5ml).
- Esperar um minuto e descartar a maior quantidade de tripsina deixando apenas um resíduo.

- Adicionar meio de crescimento e pipetar suavemente. Repetir este procedimento várias vezes para que ocorra a separação das células.
- Diluir a concentração desejada de células com meio de crescimento.
- Inocular nas microplacas de 96 poços.
- Identificar a placa.
- Incubar a 37°C por 24 horas

ANEXO 4- BIOLOGIA MOLECULAR

Material:

- Taq DNA Polimerase (Invitrogen – Brasil)
- MgCl₂ (Invitrogen – Brasil)
- Tampão PCR (Invitrogen – Brasil)
- Desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) (Eppendorf – Brasil)
- Oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen – Brasil)
- Tubos para PCR (0,5 ml) (Invitrogen – Brasil)
- Gel de agarose
- Tampão TBE (1X)
- Corante azul de bromofenol (0,25%)
- Brometo de etídio (concentração 0,5 μ g/ml)
- Cuba horizontal para eletroforese

Procedimento da eletroforese em gel de agarose

A detecção dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (37V, 1 hora) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

- Dissolver a agarose (0,25g) em TBE 1X (25ml).
- Aquecer o meio.
- Montar a cuba de eletroforese e aplicar o gel quando atingir temperatura de 45°C.
- Esperar o gel solidificar e completar a cuba com tampão TBE 1X.
- Aplicar 15 μ l da amostra e 5 μ l de azul de bromofenol (0,25%).
- Após a corrida retirar o gel da cuba e mergulhar em solução contendo brometo de etídio (0,5 μ g/ml de concentração final) durante 10 a 15 minutos.
- Visualizar em transiluminador ultravioleta (Ultralum).
- Capturar as imagens (sistema Kodak Digital Science 1D).

TABELA 1 - REATIVOS UTILIZADOS NA PCR

Componente/Concentração	Volume
DNA	5ul
Tampão de PCR (10X)	2,5ul
MgCl ₂ 50mM	0,75ul
dNTP* 5mM	1ul
Stx a 25 pmol	0,5ul
Stx b 25 pmol	0,5ul
Taq DNA Polimerase	0,25ul
H ₂ O ultra pura estéril	14,5ul
Volume Final	25ul

*dNTP – dinucleotídeo trifosfato