

**SÔNIA MARIA DE SOUZA SANTOS FARAH**

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE ESTIRPES DE  
*Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE  
BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ.**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cyntia M. T. Fadel Picheth

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

**CURITIBA  
2005**

***Dê-me Senhor,  
agudeza para entender,  
capacidade para reter  
método e faculdade para aprender,  
sutileza para interpretar,  
graça e abundância para falar***

***Dê-me Senhor,  
acerto ao começar,  
direção ao progredir  
e perfeição ao concluir.***

***São Tomás de Aquino***

À **minha família** por terem suportado comigo os momentos mais difíceis...

**Eu amo vocês!**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao completar mais esta etapa na caminhada, não posso deixar de agradecer à minha família, aos amigos, colegas e professores, pelo auxílio e cooperação que fizeram com que este trabalho tivesse o brilho especial que reflete a generosidade e talento de cada um em particular.

Agradeço a DEUS que nos ilumina sempre!

Aos meus filhos, Clarissa e Pedro Henrique, fonte maior de toda minha inspiração...

Ao filho do coração, Raphael, pela paciência e ajuda inestimável.

Ao Geraldo, Guilherme e Eduardo por dividirem comigo esta pessoa que aprendi a admirar e respeitar, pela capacidade profissional e extrema doação com que desenvolve seu trabalho. Deus abençoe você, Cyntia!

A Kinue Irino e Tânia Mara Ibelli Vaz, do Instituto Adolfo Lutz, “as meninas de São Paulo” como eu carinhosamente as chamo, realizadoras e incentivadoras.

Aos colegas do LACEN que me impulsionaram na realização dos meus objetivos.

As colegas de trabalho no Laboratório da Faculdade de Farmácia, minhas parceiras, Sílvia, Caroline, Larissa, Cibelle, Octaviana e Celene.

A Célia Fagundes Cruz e Marcelo Pilonetto, pela visão abrangente ao colaborar na parceria entre LACEN e UFPR.

**MUITO AGRADECIDA!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>03</b>
<b>2.1. <i>Escherichia coli</i> patogênica .....</b>	<b>03</b>
<b>2.2. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga .....</b>	<b>04</b>
2.2.1. Histórico .....	04
2.2.2. Fatores de Virulência.....	06
2.2.2.1. Toxina Shiga (Stx).....	06
2.2.2.2. Adesinas.....	09
2.2.2.3. Fatores adicionais de virulência .....	11
2.2.3. Manifestações Clínicas e Tratamento das Infecções por STEC.....	12
2.2.4. Epidemiologia .....	14
2.2.4.1. Fonte de infecção e formas de transmissão.....	14
2.2.4.2. Incidência de infecções causadas por STEC .....	16
2.2.5. Diagnóstico Laboratorial das Infecções por STEC .....	17
2.2.5.1. Ensaios biológicos.....	17
2.2.5.2. Ensaios imunológicos.....	18
2.2.5.3. Métodos moleculares .....	18
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Amostra.....</b>	<b>21</b>
4.1.1. Coleta das amostras.....	21
<b>4.2. Triagem para <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Ensaio de citotoxicidade em células Vero .....</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Determinação dos sorotipos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.5. Ensaio para detecção de enterohemolisina.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6. Verificação da expressão de STX através de imunoensaio.....</b>	<b>23</b>
<b>4.7. Caracterização genotípica das STEC .....</b>	<b>24</b>
4.7.1. Extração do DNA.....	24
4.7.2. PCR-Multiplex .....	24
4.7.2.1. Detecção dos produtos de PCR.....	25
4.7.3. Subtipagem dos genes <i>stx</i> <sub>2</sub> por PCR-RFLP .....	26
4.7.3.1. Amplificação dos genes <i>stx</i> .....	26
4.7.3.2. Clivagem dos produtos de PCR com endonucleases de restrição .....	27
<b>4.8. Análises estatísticas .....</b>	<b>28</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1. Triagem para <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2. Ensaio de citotoxicidade em células Vero .....</b>	<b>29</b>
<b>5.3. Classificação sorológica das STEC.....</b>	<b>31</b>
<b>5.4. Produção de enterohemolisina .....</b>	<b>32</b>
<b>5.5. Detecção de Stx pelo imunoensaio VTEC-Screen.....</b>	<b>33</b>

<b>5.6. Caracterização genotípica das STEC .....</b>	<b>33</b>
<b>5.7. Subtipagem dos genes <i>stx</i> por PCR-RFLP .....</b>	<b>36</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATCC</b>	<i>American type culture collection</i>
<b>A/E</b>	Lesão <i>attaching and effacing</i>
<b>cGMP</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> com aderência difusa
<b>dNTP</b>	desoxiribonucleotídeos trifosfato
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>ehxA</b>	Gene que codifica a enterohemolisina
<b>EspP</b>	Serina protease
<b>Gb3</b>	Globotriosil ceramida
<b>LEE</b>	<i>Locus for enterocyte effacement</i>
<b>LPF</b>	<i>Long polar fimbriae</i>
<b>kb</b>	Kilobase
<b>MENEC</b>	<i>Escherichia coli</i> causadora de meningite neonatal
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>pb</b>	Pares de base; <i>base pair</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase; <i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>PCR-RFLP</b>	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição; <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>pmol</b>	Picomol
<b>RNAr</b>	Ácido ribonucléico ribossomal
<b>Saa</b>	<i>STEC autoagglutination adhesin</i>
<b>saa</b>	Gene que codifica a adesina Saa
<b>SHU</b>	Síndrome hemolítica urêmica
<b>STEC</b>	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga

<b>stx</b>	Gene que codifica a toxina Shiga
<b>Stx</b>	Toxina Shiga
<b>TBE</b>	Tampão Tris-Borato-EDTA
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil amino metano
<b>PTT</b>	Púrpura trombótica trombocitopênica
<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	ESTRUTURA E SIMILARIDADE DAS TOXINAS SHIGA.....	08
Figura 2 –	OCORRÊNCIA DE STEC NO ESTADO DO PARANÁ POR REGIÃO GEOGRÁFICA.....	30
Figura 3 –	DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE STEC POR MICRO-REGIÕES .....	31
Figura 4 –	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES <i>saa stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> eaeA ehxA</i> ENTRE AS ESTIRPES DE STEC .....	34
Figura 5 -	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES <i>saa stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> eaeA ehxA</i> ENTRE AS ESTIRPES DE STEC .....	35
Figura 6 –	GENÓTIPOS DETECTADOS NAS ESTIRPES DE STEC .....	36
Figura 7 –	PCR-RFLP DOS GENES <i>stx</i> MOSTRANDO PERFIS COMPATÍVEIS COM <i>stx<sub>2</sub> (stx<sub>2</sub>-EDL933) E stx<sub>2c</sub></i> .....	38
Figura 8 –	PCR-RFLP DOS GENES <i>stx</i> MOSTRANDO PERFIS COMPATÍVEIS COM <i>stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> stx<sub>2v</sub>hb e stx<sub>2c</sub></i> .....	39
Figura 9 -	PCR- RFLP DOS GENES <i>stx</i> MOSTRANDO PERFIS COMPATÍVEIS COM <i>stx<sub>2c</sub> e stx<sub>2O111/stx<sub>2vOX392</sub></sub></i> .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – INICIADORES UTILIZADOS PARA PCR-MULTIPLEX.....	25
Tabela 2 – INICIADORES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR-RFLP .....	26
Tabela 3 – PERFIL DE PCR-RFLP PARA OS GENES <i>stx</i> .....	27
Tabela 4 – FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE STEC DE ACORDO COM AS MICRO-REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ .....	29
Tabela 5 – SOROTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE STEC E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS .....	32
Tabela 6 – GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NAS ESTIRPES DE STEC .....	34
Tabela 7 – SUBTIPOS DE GENES <i>stx</i> IDENTIFICADOS POR PCR-RFLP ENCONTRADOS ISOLADAMENTE OU EM ASSOCIAÇÃO COM OUTROS GENES.....	37
Tabela 8 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DAS STEC E REGIÃO DE OCORRÊNCIA.....	41

## RESUMO

O propósito deste trabalho foi avaliar a ocorrência de STEC em bovinos de corte do Estado do Paraná. Amostras fecais de 107 bovinos aparentemente saudáveis, provenientes de 41 municípios do Estado, foram coletadas em um abatedouro da cidade de Curitiba. As amostras foram transportadas em meio de Cary-Blair, inoculadas em ágar MacConkey-Sorbitol (SMAC) e incubadas a 35° C por 24 horas. Colônias presuntivamente identificadas como *Escherichia coli* (aproximadamente 6 colônias/amostra) foram avaliadas quanto à produção de toxina através do ensaio de citotoxicidade em células Vero. As amostras produtoras de toxina tiveram seus antígenos somático e flagelar determinados. Uma colônia/amostra, com exceção daquelas em que mais de um sorotipo de STEC foi encontrado, foi analisada quanto à produção de toxina Shiga utilizando o imunoensaio VTEC-Screen; para a produção de enterohemolisina, utilizando ágar sangue acrescido de CaCl<sub>2</sub>; e quanto à presença dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* e *saa* por PCR-Multiplex. A subtipagem dos genes *stx*<sub>2</sub> foi realizada por PCR-RFLP. A presença de STEC foi detectada em 61 dos 107 bovinos (57%). Em 3 amostras foram encontradas 2 tipos diferentes de STEC. Trinta e um sorotipos foram encontrados, três ainda não tinham sido associados com STEC segundo a literatura. A produção de enterohemolisina foi detectada em 39 (61%) das STEC. O imunoensaio VTEC-Screen detectou a presença de toxinas Shiga em apenas 48 (77,4%) das 62 estirpes de STEC, apresentando 22,6% de falsos resultados negativos. O gene *stx*<sub>1</sub> foi encontrado em 2 (3,1%) estirpes, *stx*<sub>2</sub> em 35 (54,7%), e ambos os genes em 27 (42,2%) estirpes. O gene *ehxA* foi detectado em 46 (71,9%) estirpes, *saa* em 40 (62,5%) e *eaeA* 04 estirpes (6,2%). Sete genótipos foram encontrados: *stx*<sub>1</sub> *ehxA* *saa* e *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> *ehxA* em 2 (3,1%) estirpes cada; *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *eaeA* e *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> em 4 (6,25%); *stx*<sub>2</sub> em 14 (21,9%); *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *saa* em 17 (26,6%) e *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *saa* em 21 (32,8%) das estirpes de STEC. Em 11 estirpes não houve amplificação dos genes *stx*<sub>2</sub> no protocolo de PCR para a subtipagem de *stx*<sub>2</sub>. Nas 51 STEC em que a subtipagem foi realizada, o gene *stx*<sub>2</sub> foi detectado em 15 estirpes; *stx*<sub>2c</sub> em 7; *stx*<sub>2vhb</sub> e *stx*<sub>2vO111</sub> / *stx*<sub>2vOX392</sub> em 1; as associações *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> em 14 estirpes, *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2c</sub> e *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> em 3, *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> em 4, e *stx*<sub>2</sub> *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> e *stx*<sub>2c</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> em 1 estirpe cada.

Palavras – chave: *Escherichia coli*, STEC, toxina Shiga, *stx*

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the occurrence of STEC in beef cattle from Paraná. Faecal swabs from 107 healthy animals, from 41 localities of the State, were collected in a slaughterhouse in Curitiba city. Faecal samples were transported in Cary-Blair medium, inoculated in MacConkey-Sorbitol (SMAC) agar and incubated at 35° C for 24 hours. Colonies of *Escherichia coli* (approximately 6 colonies/sample) were tested for toxin production using the cytotoxicity assay in Vero cells. The surface antigens O and H of STEC were then determined. A colony for sample, except for those samples in which more than one serotype of STEC was found, was analyzed by the immunoassay VTEC-Screen for production of Shiga-toxin; enterohaemolysin production was tested in blood agar plates containing CaCl<sub>2</sub>; presence or not of genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* e *saa* was determined by a PCR-Multiplex assay using primers specific for each gene. Subtyping of *stx*<sub>2</sub> genes was realized using PCR-RFLP. Presence of STEC was detected in 61 of the 107 (57%) bovine tested. In 3 samples 2 different serotypes of STEC strains were found. Thirty one serotypes were found among the strains, of these, three have not been associated with STEC yet. Enterohaemolysin production was detected in 39 (61%) of the STEC. The immunoassay VTEC-Screen detected presence of Shiga toxins in only 48 (77,4%) of the 62 STEC strains tested. The assay showed 22,6% of false negative results. The *stx*<sub>1</sub> gene was found in 2 (3,1%) strains, *stx*<sub>2</sub> in 35 (54,7%), and both genes in 27 (42,2%) strains. The *ehxA* gene was detected in 46 (71,9%) strains, *saa* in 40 (62,5%) and *eaeA* in 04 strains (6,2%). Seven different genotypes were identified: *stx*<sub>1</sub> *ehxA* *saa* e *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> *ehxA* in 2 (3,1%) strains each; *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *eaeA* and *stx*<sub>1</sub>*stx*<sub>2</sub> in 4 (6,25%); *stx*<sub>2</sub> in 14 (21,9%); *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *saa* in 17 (26,6%) and *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *saa* in 21 (32,8%) of the STEC strains. Subtyping of *stx*<sub>2</sub> gene was not possible for 11 strains for which DNA amplification did not occur in the PCR protocol used. Subtyping of *stx*<sub>2</sub> genes was realized only for 51 STEC for which the following results were observed: presence of *stx*<sub>2</sub> gene was detected in 15 strains; *stx*<sub>2c</sub> in 7; *stx*<sub>2vhb</sub> and *stx*<sub>2vO111</sub> / *stx*<sub>2vOX392</sub> in 1 strain each; combination *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> was found in 14 strains, *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2c</sub> and *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub>.*stx*<sub>2vhb</sub> in 3, *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> in 4, and *stx*<sub>2</sub> *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> and *stx*<sub>2c</sub> *stx*<sub>2vhb</sub> in 1 strain each.

Key-words: *Escherichia coli*, STEC, Shiga toxin, *stx*

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é o bacilo gram negativo anaeróbio facultativo predominante da microbiota intestinal dos humanos e dos animais. Entretanto, determinadas estirpes são reconhecidamente patogênicas e podem provocar várias doenças nos humanos, como a diarreia, meningite, septicemia e infecções do trato urinário (NATARO e KAPER, 1998).

*Escherichia coli* pode ser isolada facilmente de espécimes clínicos em meios de cultura comuns ou seletivos, incubados à 37°C sob condições aeróbicas e são facilmente identificadas por testes bioquímicos.

A sorotipagem de *Escherichia coli* ocupa um lugar central na história deste patógeno. Kauffman, em 1944, propôs um esquema para classificação sorológica que ainda continua sendo utilizado com algumas modificações. A classificação baseia-se na caracterização dos antígenos somáticos (O), flagelares (H), e capsulares (K). A combinação entre os antígenos O e H define o sorotipo de uma estirpe.

Os sorotipos e sorogrupos têm sido utilizados como marcadores para clones virulentos e específicos; no entanto o método de sorotipagem não é adequado para caracterizar uma estirpe de *Escherichia coli* como patogênica, uma vez que não apresenta relação direta com a virulência.

A identificação das categorias patogênicas de *Escherichia coli* deve considerar as características que determinam a virulência destes organismos. As principais categorias diarreogênicas *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* com aderência difusa (DAEC) e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, conseqüência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade localizados no cromossomo, além da presença de bacteriófagos.

O principal fator de virulência nas *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), a toxina Shiga, é codificada por um bacteriófago que se insere no cromossomo (PATON e PATON, 1998a). STEC é um patógeno emergente veiculado

por alimentos que traz sérias implicações para a saúde humana, podendo causar desde uma diarreia branda até complicações extra-intestinais severas como Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (EKLUND *et al.* 2002).

O sorotipo O157:H7 é o mais frequentemente envolvido em surtos, entretanto, mais de 400 sorotipos de STEC, denominados de STEC não O157, já foram descritos em humanos (<http://www.microbionet.com.au/vtec.htm>; KARMALI, 2005). No Brasil, a pesquisa do sorotipo O157:H7 nos Laboratórios Nacionais de Saúde Pública foi recentemente implantada (2001) e a pesquisa de STEC não O157 ainda está restrito a poucos laboratórios.

O gado bovino é considerado o principal reservatório de STEC, com taxas de prevalência variando entre as regiões e conforme os métodos de pesquisa utilizados (CERQUEIRA, 2000; PARK *et al.* 1999; TUTENEL *et al.* 2003). Linhagens distintas dos bovinos, composição da dieta, tamanho do rebanho, idade dos animais, condições de stress, podem ser alguns dos fatores que contribuem para a obtenção de prevalências variáveis de STEC nestes reservatórios (COBBOLD *et al.* 2004). No Brasil, ainda são poucos os estudos sobre a ocorrência de STEC em rebanho bovino (CERQUEIRA *et al.* 1999; LEOMIL *et al.* 2003; IRINO *et al.* 2005). No Paraná, SILVA (2002) relatou pela primeira vez a ocorrência de O157:H7 nos bovinos de corte; no entanto, a prevalência de STEC não O157 ainda é desconhecida no Estado.

O conhecimento das características fenotípicas e genotípicas das STEC isoladas em rebanho bovino de distintas regiões do Paraná, é um grande passo no sentido de conhecer melhor a epidemiologia dessas doenças. Assim, este trabalho tem por propósito descrever a prevalência de STEC não O157 e suas características, em bovinos de corte no Estado do Paraná.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Escherichia coli* patogênica

As estirpes de *E. coli* capazes de provocar doença são classificadas como patógenos intestinais e extraintestinais, segundo o local de isolamento (ORSKOV e ORSKOV, 1985; LIOR, 1994; KAPER *et al.* 2004).

As *Escherichia coli* extra intestinais são classificadas como: MENECA (*E. coli* que causam meningite) causa da meningite neonatal; UPEC (*E. coli* uropatogênica) agentes de infecções do trato urinário de humanos e dos cães, e SEPEC (*E. coli* septicêmica) responsáveis por sepsis em humanos, leitões e bezerros.

Estirpes de *Escherichia coli* causadoras de diarreia são classificadas em seis categorias, de acordo com as características de virulência, que incluem produção de toxina, capacidade de invasão e a adesão às células do hospedeiro, entre outras (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004):

#### ***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

EPEC coloniza a mucosa intestinal e afeta as células epiteliais, produzindo uma lesão histopatológica característica descrita como ‘attaching and effacing” (A/E). Essa lesão é devida à íntima adesão da EPEC às células do epitélio intestinal, provocando alterações no citoesqueleto e levando ao acúmulo de actina polimerizada diretamente abaixo do local onde se encontra a bactéria aderida. As microvilosidades são destruídas e podem surgir estruturas do tipo pedestal nas células epiteliais. A habilidade de induzir a formação de lesões A/E decorre da presença de uma proteína de membrana externa denominada intimina (McDANIEL *et al.* 1995; KAPER *et al.* 2004).

#### ***Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC coloniza a mucosa do intestino delgado e elabora enterotoxinas termo-lábeis (LT) e/ou termo-estáveis (ST) que induzem uma diarreia aquosa.

#### ***Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)**

Invadem as células epiteliais do cólon e em seguida provocam a lise do vacúolo endocítico. Movem-se no citoplasma da célula através da polimerização de microfilamentos de actina. A bactéria pode mover-se lateralmente através do epitélio, por disseminação direta de célula a célula e penetrar novamente na

membrana plasmática pela superfície basolateral. Os genes requeridos nesse processo estão localizados em um plasmídeo de virulência. O plasmídeo codifica um sistema de secreção tipo III e uma proteína de membrana externa associada com a polimerização da actina. EIEC pode causar colite invasiva inflamatória, e ocasionalmente disenteria, mas na maioria dos casos provoca diarreia aquosa que não se diferencia das provocadas por outras categorias diarregênicas de *Escherichia coli*.

#### ***Escherichia coli* com aderência difusa (DAEC)**

DAEC são caracterizadas por apresentarem um padrão de aderência difuso às células HEP-2. Produzem um efeito citopático caracterizado pelo desenvolvimento de uma longa extensão celular que envolve a bactéria. Causam diarreia em crianças, particularmente, naquelas maiores de 1 ano de idade.

#### ***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

Aderem ao epitélio do intestino formando um padrão descrito como auto-agregativo, formando um denso biofilme. A estratégia básica da infecção parece ser a colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas. Causam diarreia persistente em crianças e adultos.

#### ***Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC)**

Caracterizadas pela produção de uma potente citotoxina envolvida no desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica (SHU), púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) e colite hemorrágica (CH) em humanos.

## **2.2. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)**

### **2.2.1. Histórico**

Em 1955, a síndrome hemolítica urêmica foi descrita e caracterizada primeiramente por GASSER, como um quadro de insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática.

Em 1977, KONOWALCHUK *et al.* demonstraram que determinadas estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de pacientes com diarreia, produziam uma citotoxina com efeito letal sobre células Vero.



Durante a investigação de dois surtos de colite hemorrágica e SHU, ocorridos em 1982, foi constatado que ambos estavam associados a *Escherichia coli* sorotipo O157:H7, até então de ocorrência rara (RILEY *et al.*; 1983). A denominação de EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica) foi adotada devido às características dos sintomas clínicos causadas nos indivíduos afetados.

Em 1983, O'BRIEN e colaboradores relataram que *Escherichia coli* do sorotipo O157:H7 era responsável por um surto de colite hemorrágica nos EUA e que estes microorganismos produziam uma toxina similar à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1.

KARMALI *et al.* (1985) mostraram que estirpes de *Escherichia coli* produtoras da toxina Shiga estavam epidemiologicamente associadas a casos de SHU. No mesmo ano, SCOTLAND e colaboradores (citados por PARK *et al.* 1999), demonstraram que os genes que codificam a toxina Shiga em *Escherichia coli* eram carreados em bacteriófagos.

Atualmente a denominação STEC é utilizada para se referir a um grupo de *Escherichia coli* que apresenta como característica em comum a produção de toxina Shiga. Além da *Escherichia coli* O157:H7, outros sorotipos de STEC, conhecidos como STEC não-O157, também provocam doenças em humanos e são predominantes em vários países (BEUTIN *et al.* 1994; SCHMIDT e KARCH, 1996; BEUTIN, ZIMMERMANN e GLEIER, 1998; BOERLIN *et al.* 1999; FEY *et al.* 2000; VAZ *et al.* 2004).

JOHNSON e colaboradores (1996), descreveram um surto de doença diarréica causada por *Escherichia coli* O111:H<sup>-</sup> que ocorreu em vários estados americanos em 1950. Neste surto, houve numerosas mortes em crianças e os pacientes apresentaram sintomas similares aos observados na Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). Este provavelmente foi o primeiro surto causado por STEC a ser documentado (DEREK LAW, 2000).

As STEC são similares às cepas não patogênicas de *Escherichia coli* quanto às propriedades bioquímicas e pertencem a diversos grupos sorológicos, causando dificuldades para o seu diagnóstico nos laboratórios de rotina. Somente as propriedades de virulência como a produção de toxina Shiga, permite distinguir entre as estirpes de STEC e as *Escherichia coli* comensais do intestino (TSCHAPE; FRUTH, 2001).

### 2.2.2. Fatores de Virulência

As STEC podem apresentar uma variedade de fatores de virulência. O repertório desses fatores varia entre e dentro dos diversos sorotipos, entretanto, a habilidade de produzir uma ou mais toxinas Shiga é universal, e representa o principal fator de virulência de STEC (PATON e PATON, 1998; BOERLIN et al. 1999).

#### 2.2.2.1. Toxinas Shiga (Stx)

As STEC se diferenciam de outras *Escherichia coli* pela produção de toxinas Shiga. Existem dois tipos principais de toxina Shiga produzidos por STEC denominados Stx1 e Stx2. Essas toxinas são relacionadas geneticamente e apresentam atividades biológicas similares, mas são distintas antígenicamente, não ocorrendo neutralização cruzada frente a anticorpos anti-Stx1 ou anti-Stx2. A atividade citotóxica de Stx1 foi neutralizada por anticorpos anti-toxina Shiga, o que não ocorreu com Stx2 (STROCKBINE et al. 1986).

Juntamente com Stx produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo1, essas toxinas são classificadas na família das toxinas Shiga, que apresentam uma estrutura do tipo AB<sub>5</sub> (FAN et al., 2000), contendo uma subunidade A e cinco subunidades B (FIGURA 1). A subunidade A é composta de dois fragmentos A1 e A2, ligados através de uma ponte dissulfeto. É o componente ativo da toxina e é ligada de forma não covalente a cinco unidades B idênticas. O pentâmero de subunidades B é responsável pela ligação da toxina aos receptores glicolipídicos do tipo Gb3 na superfície das células alvo (SCHMIDT *et al.* 1999), uma função retida mesmo na ausência da subunidade A. Entretanto, a holotoxina AB<sub>5</sub> é necessária para os efeitos tóxicos.

Após a ligação aos receptores Gb3, as moléculas de toxina são internalizadas por endocitose mediada pelo receptor e transportadas ao retículo endoplasmático. A subunidade A é translocada para o citoplasma e ativada após a clivagem do peptídeo A2. O peptídeo A1 apresenta atividade de RNA N-glicosidase e remove uma adenina do rRNA 28S do ribossomo eucariótico, alterando a função do ribossomo que não é mais capaz de interagir com os fatores de alongação EF1 e

EF2. Dessa forma ocorre inibição da síntese de proteínas levando à morte as células endoteliais renais, células epiteliais intestinais, células Vero ou HeLa, e outras células que possuam o receptor Gb3 (NATARO e KAPER; 1998; MAINIL e DAUBE, 2005).

A especificidade desta interação e a distribuição dos receptores Gb3 entre vários tipos de células têm um grande impacto na patogênese da doença. A expressão de Gb3 ocorre em células epiteliais renais humanas, particularmente na região cortical, o principal local de lesão em pacientes com SHU (PATON, PATON; 1998a).

O seqüenciamento dos genes que codificam as toxinas Shiga *stx*, *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>*, respectivamente para as toxinas produzidas por *Shigella dysenteriae* do tipo 1, e Stx1 e Stx2 por STEC, permitiu elucidar e comparar as estruturas desses genes e a seqüência deduzida de aminoácidos dessas proteínas.

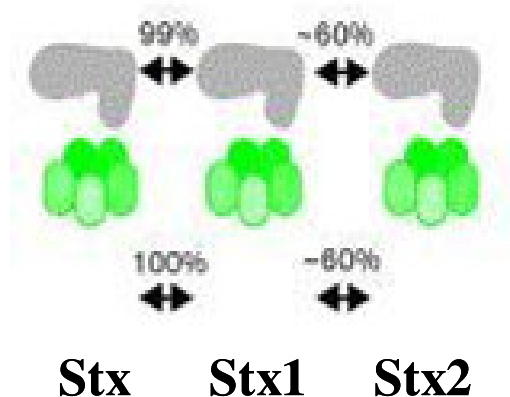
Os genes para as subunidades A e B constituem um operon, no qual o gene que codifica a subunidade A (*stxA*) precede a subunidade B (*stxB*) (JACKSON, 1987).

A comparação da seqüência de nucleotídeos dos genes *stx* e *stx<sub>1</sub>* revelou que ambos são praticamente idênticos, diferindo em apenas 3 nucleotídeos localizados em 3 diferentes codons das subunidades A. Somente um resulta em substituição de aminoácido (CALDERWOOD *et al.* 1987; STROCKBINE *et al.* 1988).

Os genes *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>* apresentam 58% de homologia na seqüência de nucleotídeos; na seqüência deduzida de aminoácidos a homologia é de 56% (FIGURA 1) (CALDERWOOD *et al.* 1987; JACKSON *et al.* 1987).

Os genes *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>* estão localizados no genoma de fagos que se integram ao cromossomo da célula hospedeira. A presença destes genes em fagos proporciona a sua disseminação entre diferentes estirpes, assim como possibilita a sua coexistência em uma mesma bactéria. Assim, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente (PATON e PATON, 1998a).

**FIGURA 1 – ESTRUTURA E SIMILARIDADE DAS TOXINAS SHIGA**



A subunidade A está representada em cor cinza, e o pentâmero das subunidades B em verde. Os números indicam a similaridade entre as toxinas Shiga produzidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Stx) e STEC (Stx1 e Stx2).

\* Retirado de FAN *et al.* 2000.

Substituições de nucleotídeos encontradas nas seqüências de *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> em algumas estirpes de STEC levaram à descrição de formas variantes das toxinas. O grupo das toxinas Stx1 é homogêneo com poucas variantes descritas, destacando-se *stx*<sub>1c</sub> (ZHANG *et al.* 2002; BURK *et al.* 2003). O grupo das toxinas Stx2 é bastante heterogêneo, com 26 variantes já descritas (NAKAO *et al.* 2002). Compreende variantes que apresentam alta similaridade (~96% na seqüência de aminoácidos da subunidade B e de 99 a 100% na subunidade A) com Stx2 como Stx2c, Stx2vha, Stx2vhb e Stx2Ox393; em outras como Stx2d-O111, Stx2d-Ount, Stx2d-OX392, a similaridade é de aproximadamente 86% para a subunidade B e 95% para a subunidade A. As variantes mais distantemente relacionadas a Stx2 são Stx2va e Stx2f, que apresentam similaridade para as subunidades B e A de 80,9 e 69,5%, respectivamente (BASTIAN *et al.* 1998; PIÉRARD *et al.* 1998; NAKAO *et al.* 2002).

O tipo de toxina produzido por uma STEC parece ser um determinante importante no desenvolvimento de SHU. Dados epidemiológicos e estatísticos sugerem que as estirpes que expressam Stx2 são mais freqüentemente associadas a casos de SHU do que aquelas que expressam somente Stx1 (BOERLIN *et al.* 1999; EKLUND *et al.* 2002).

#### 2.2.2.2. Adesinas

Embora dados substanciais tenham sido acumulados sobre a patogenicidade das STEC nos últimos anos, poucas informações estão disponíveis sobre os mecanismos de adesão utilizados por esses organismos. A compreensão deste mecanismo de interação patógeno-hospedeiro pode ajudar a identificar novos alvos para terapia e estabelecer os efeitos que a adesão desencadeia sobre as células (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

##### Intimina

A intimina, proteína responsável pela adesão nas EPEC, também está presente em algumas estirpes de STEC. Media a ligação íntima da bactéria às células intestinais, além de estimular a resposta imune do hospedeiro e a hiperplasia das criptas intestinais. É codificada pelo gene *eaeA*, localizado em uma ilha de patogenicidade (PAI) denominada LEE (*locus for enterocyte effacement*). Além de *eaeA*, essa região contém outros genes associados com virulência (PERNA et al., 1998), como o Sistema de Secreção do tipo III (TTSS) e o receptor da Intimina (Tir), que é translocado para a membrana plasmática da célula do hospedeiro pelo TTSS (SCHMIDT e HENSEL, 2004; CAPRIOLI et al, 2005).

As STEC incluídas no grupo das *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), exploram componentes da membrana e do citoesqueleto da célula hospedeira para colonizar a mucosa intestinal. Essas STEC tem a habilidade de induzir nos enterócitos uma lesão característica denominada “attaching and effacing” (A/E), caracterizada pela destruição localizada das microvilosidades da borda escovada do intestino, forte adesão da bactéria e reorganização do citoesqueleto da célula hospedeira (CHINA et al. 1996; FRANKEL et al. 1998).

Três estágios são reconhecidos na formação da lesão A/E. O primeiro é a aderência inicial da bactéria à superfície das células, desencadeando a expressão de vários genes localizados na PAI LEE. Esse fator de aderência primário ainda não foi identificado. O segundo estágio consiste em enviar proteínas efetoras à célula eucariótica através do sistema de secreção tipo III. Todos os genes envolvidos

nesse processo são codificados na PAI LEE. Através da fosforilação de várias proteínas da célula eucariótica, as proteínas secretadas pela bactéria causam polimerização da actina, rearranjos do citoesqueleto e destruição das microvilosidades do enterócito. O terceiro estágio é a aderência íntima da bactéria à membrana citoplasmática do enterócito. A adesina bacteriana é a intimina, e o receptor também é uma proteína bacteriana – Tir (*translocated intimin receptor*). Nesse estágio os rearranjos do citoesqueleto são amplificados, gerando um pedestal sob o local onde a bactéria está aderida (MAINIL e DAUBE, 2005).

Os genes associados com o desenvolvimento da lesão A/E estão contidos em uma região de aproximadamente 36 kb, na ilha de patogenicidade LEE, que foi descrita primeiramente em EPEC. Essa região contém 41 *open reading frames* (ORF) dispostos na mesma ordem em EPEC e STEC. Os genes *eae* que codificam a intimina em EPEC e STEC apresentam 87% de identidade (FRANKEL *et al.* 1998). Diversas variantes de *eaeA* têm sido descritas, algumas são associadas com EPEC ou STEC, outras podem ser encontradas em ambas (ZHANG *et al.* 2002).

Estirpes de STEC que apresentam os genes *eaeA* e *stx<sub>2</sub>* têm sido descritas mais freqüentemente, associadas com doença severa no homem (BOERLIN *et al.* 1999).

#### Adesina Saa (STEC *autoagglutination adhesin*)

A adesina Saa foi primeiramente identificada na STEC O113:H21 isolada de um surto de SHU. Essa estirpe não contém a ilha de patogenicidade LEE. O gene *saa* que codifica esta adesina foi localizado em um megaplasmídeo, cuja eliminação resultou na redução da aderência da bactéria. Homólogos de *saa* também foram descritos em outras cepas de STEC LEE negativas, isoladas de casos de SHU ou diarreia, mas não foram encontradas em estirpes portadoras da ilha de patogenicidade LEE (PATON *et al.* 2001; JENKINS *et al.* 2003).

## Outras proteínas de adesão

Estudos recentes têm sugerido a existência de outras adesinas em STEC LEE positivas. TARR *et al* (2000) descreveram Iha (IrgA homologue adhesin), uma proteína estruturalmente diferente de outras adesinas, homóloga a IrgA (iron-regulated gene A) de *Vibrio cholerae*. A participação de Iha na patogênese de STEC ainda não foi definida.

A proteína de membrana externa OmpA, descrita na STEC sorotipo O157:H7 também foi associada com aderência em células HeLa (TORRES; KAPER, 2003). Os produtos do operon *lpfABCCDE* estão associados com a expressão de fímbrias. Quando esses genes foram introduzidos em estirpes de *Escherichia coli* não fimbriadas, levaram à expressão de fímbrias e adesão em células eucarióticas, o que sugere que desempenhem função de adesina em STEC (TORRES *et al.* 2002). Os genes *lpf* (*long polar fimbria*), identificados inicialmente no sorotipo de STEC O113:H21, e posteriormente em outras estirpes LEE positivas e negativas, possivelmente estão implicados no mecanismo de adesão. A deleção destes genes resultou na redução da virulência da STEC O113:H21 (DOUGHTY *et al.* 2002).

### 2.2.2.3. Fatores adicionais de virulência

Além da participação de bacteriófagos e PAIs, a presença de plasmídeos também pode afetar as propriedades de virulência das STEC. O plasmídeo pO157, de aproximadamente 92 kb, é encontrado na maioria das estirpes do sorotipo O157:H7 de STEC e contém vários genes associados à virulência (BURLAND *et al.* 1998).

A produção de enterohemolisina é uma característica associada ao pO157, mas os genes da enterohemolisina também podem ser encontrados em outros plasmídeos de alta massa molecular presentes em STEC (BRUNDER *et al.* 1999).

A enterohemolisina pertence à família RTX de citolisinas formadoras de poros. É codificada pelo gene *ehxA*, presente no operon *ehxCABD* que contém os genes necessários para a síntese e exportação desta proteína.

SCHMIDT e colaboradores (1995) demonstraram que a enterohemolisina está relacionada com um sistema de secreção deficiente. O fenótipo enterohemolítico é caracterizado por pequenas zonas de hemólise que ocorrem depois de 18-24h de incubação à 37°C e pode ser detectado apenas em ágar sangue preparado com sangue desfibrinado de carneiro lavado em tampão fosfato, em contraste com a  $\alpha$ -hemolisina que produz halos grandes e claros de hemólise após 4-6h de incubação (SCHMIDT et al. 1996).

A enterohemolisina é uma proteína monomérica que se insere na membrana citoplasmática das células alvo eucarióticas e forma poros. Embora seu papel na patogenicidade das STEC não tenha sido esclarecido, aparentemente a sua presença aumenta a capacidade dessas bactérias em causar infecções extra-intestinais (SCHMIDT *et al.* 1999).

Outros genes de virulência encontrados no pO157 incluem os que codificam para a enzima bifuncional catalase peroxidase (KatP) e para a serina protease (EspP). A produção de EspP foi relacionada com a exacerbação da hemorragia, já que a clivagem do fator V de coagulação por esta enzima, pode resultar numa diminuição do processo de coagulação levando a um sangramento prolongado (KARCH *et al.* 1998).

Outro fator de origem cromossomal que pode contribuir para a patogênese da diarreia aquosa verificada nos estágios iniciais da infecção, é a enterotoxina estável ao calor (EAST1), que provavelmente atua na secreção intestinal de água e eletrólitos agindo sobre o modulador fisiológico de sinalização intracelular cGMP (FASANO, 1997).

### 2.2.3. Manifestações Clínicas e Tratamento das Infecções por STEC

A infecção por STEC inicialmente envolve um estágio de diarreia aquosa, que pode progredir, dentro de 1-2 dias, para diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica. Dores abdominais severas são frequentemente relatadas. Em 10% dos afetados, a infecção pode evoluir para SHU (WHO/CSR/APH/98.8, 1998), que é caracterizada pela tríade falência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia. Além da SHU, que é a principal complicação da infecção por STEC, alguns indivíduos com gastroenterite podem apresentar perfuração do cólon



ou gangrena com peritonite e septicemia, prolapso retal, pancreatite, coma, hemiplegia e convulsões (CLEARY, 2004; TARR *et al.* 2005).

Apesar de a SHU ocorrer em indivíduos de qualquer faixa etária, sua incidência é mais alta em crianças menores de 5 anos e nos idosos, o que pode ser uma consequência do sistema imunológico imaturo em crianças e do declínio do mesmo em idosos. A SHU é considerada como a principal causa de insuficiência renal aguda na população pediátrica (PATON e PATON, 1998a).

A Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) é uma variante de SHU. Sua incidência é maior em adultos. As características da doença são essencialmente as mesmas da SHU, diferindo por apresentar febre mais frequentemente e envolvimento neurológico mais graves.

A fisiologia da lesão gastrointestinal é bastante complexa e envolve além da função desempenhada pelas toxinas, outros fatores bacterianos e do hospedeiro.

Após a ingestão as STEC aderem às células epiteliais e colonizam o intestino. O período de incubação pode variar de 1 a 10 dias. No intestino as STEC ativam mecanismos de defesa do hospedeiro, a liberação de interleucina 8 (IL-8) e produzem toxinas. A toxina e o lipopolissacarídeo (LPS) absorvidos pelo trato gastrointestinal induzem dano às células endoteliais micro-vasculares e provocam colite hemorrágica. A lesão endotelial e a IL-8 facilitam o recrutamento dos leucócitos. Hemácias, neutrófilos, monócitos e plaquetas servem de ligação para Stx e são menos sensíveis à ação citotóxica da mesma. Grandes quantidades de toxina podem se ligar aos neutrófilos e serem transportadas para as células endoteliais glomerulares. Além disso, as Stx induzem também a liberação de citocinas dos leucócitos e monócitos, que podem regular a expressão de Gb3 e sensibilizar as células endoteliais glomerulares à sofrer ação citotóxica da Stx.

Toxina livre e toxina ligada aos neutrófilos induzem dano às células tubulares renais e células endoteliais glomerulares. Alternativamente, as citocinas podem ativar o sistema fibrinolítico de coagulação, sinergicamente, ou independentemente das Stx. Todos estes fatores induzem dano endotelial e acúmulo de fibrina, levando à anemia hemolítica com esquistócitos, trombocitopenia e insuficiência renal aguda.

Ainda não há tratamento específico para as infecções causadas por STEC e a prevenção destas infecções deve ser prioridade. Crianças com diarreia ou colite hemorrágica causada por STEC, normalmente recusam-se a receber líquidos, têm

vômitos e severas dores abdominais. Estes sintomas levam à desidratação, sendo necessários cuidados na hidratação do paciente desde o estágio inicial da infecção. Deve-se evitar o uso de drogas antimotilidade, que estão associadas com complicações e prolongamento dos sintomas. Antibióticos não devem ser administrados a pessoas com possível infecção por STEC, pois há evidências de que determinados antibióticos estimulam o aumento da produção de toxinas tornando-as mais disponíveis para absorção, o que pode levar a um agravamento do quadro clínico (KAPLAN *et al.* 1998; ZHANG *et al.* 2000; O'LOUGHLIN e ROBINS-BROWNE, 2001; WONG *et al.* 2000; RAY *et al.* 2001; TARR *et al.* 2005).

Novas estratégias terapêuticas para o combate a SHU estão sendo desenvolvidas visando prevenir a ligação da toxina às células alvo. Uma delas é a administração de Synsorb-Pk, uma resina sílica coloidal (Chromosorb) que se liga à Stx1 e Stx2, e parece ser capaz de absorver a toxina produzida no trato gastrintestinal (RAY e LIU, 2001).

#### 2.2.4. Epidemiologia

##### 2.2.4.1. Fonte de infecção e formas de transmissão

As STEC são encontradas no intestino de animais sadios, sendo o principal reservatório o gado bovino, e também no meio ambiente onde os animais são mantidos (FENG, 1995). Nos bovinos aparentemente os receptores Gb3 estão presentes apenas no cérebro e no rim, e a falta destes receptores no intestino explicaria a ausência da doença intestinal nestes animais (PRUIMBOOM-BREES *et al.* 2000).

A excreção de STEC nos bovinos parece estar relacionada à alimentação do animal. A influência da dieta está baseada na habilidade da *Escherichia coli* em desenvolver resistência ao pH ácido, aumentando o risco de doenças de origem alimentar no homem. O uso de ração rica em grãos na alimentação do gado é responsável por baixar o pH do cólon devido aos ácidos produzidos na fermentação. Nesses animais as STEC acabam adquirindo resistência aos ácidos além de serem encontradas em maior quantidade (DIEZ-GONZALEZ *et al.* 1998).

A acidez estomacal é considerada uma barreira à infecção pelos enteropatógenos, mas devido à adaptação ocorrida no rúmen do bovino, as STEC tornaram-se capazes de resistir a este mecanismo de defesa (CRAY *et al.* 1995). A resistência ao pH ácido do estômago também é uma característica importante para a virulência das STEC, pois permite que estes organismos sejam capazes de desencadear doença mesmo quando presentes em baixo número no alimento contaminado (PATON e PATON, 1998a).

Embora o bovino seja considerado o principal reservatório da doença provocada por STEC, estirpes de STEC têm sido isoladas de vários animais domésticos e selvagens (HANCOCK *et al.* 1998).

Os casos de infecção por STEC estão associados com a ingestão de carne mal cozida, leite não pasteurizado e derivados contaminados. A associação com alimentos industrializados sugere que os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos eventualmente acabam contribuindo para a disseminação da doença, como ocorre na produção em massa de hambúrgueres, sucos, e outros alimentos, onde pequenas quantidades de alimentos contendo STEC acabam contaminando porções maiores do produto final (BERKELMAN, 1997).

A transmissão da doença pessoa a pessoa, facilitada pela baixa dose infectante, também tem sido documentada (WHO/CSR/APH/98.8, 1998; FENG, 1995).

A resistência das STEC às condições desfavoráveis do meio e a baixa dose de infectividade, também são fatores que contribuem para a sua habilidade em causar doenças transmitidas por alimentos (DIEZ-GONZALEZ *et al.* 1998).

A capacidade das STEC de sobreviver por mais de dez meses no meio ambiente constitui outro risco de contaminação para o homem, pois a infecção pode ser adquirida pela dispersão aérea destes microrganismos (VARMA *et al.* 2003). A manipulação destes patógenos pelos profissionais nos laboratórios também tem sido relatado como uma outra via de contaminação por STEC (SPINA *et al.* 2005).

#### 2.2.4.2. Incidência de infecções causadas por STEC

Na Argentina, particularmente em Buenos Aires e nos subúrbios, a incidência de SHU é considerada como sendo de 7 a 10 vezes maior que a relatada em outros países (LOPES *et al.* 1998).

Na Europa, os países com maior incidência de SHU são a Alemanha com 19 casos para cada 100.000 crianças até 15 anos, seguida pela Holanda, Suíça e Bélgica com 1,5 casos para 100.000 crianças. Incidências menores são encontradas nos países do sul da Europa (CAPRIOLI e TOZZI, 1998).

No Canadá, o maior surto descrito foi notificado em 1991 entre os esquimós com 521 casos, sendo 22 casos de SHU com duas mortes (SPIKA, 1998).

Durante o verão de 1995 foi descrito o primeiro surto causado por STEC na Austrália, no qual o sorotipo O111:H<sup>-</sup> foi implicado. Cerca de 200 pessoas foram afetadas, apresentando diarreia ou colite hemorrágica, 22 crianças desenvolveram SHU e 4 adultos foram diagnosticados com TTP. A fonte de contaminação foi uma salsicha preparada com carne bovina (PATON *et al.* 1996; ROBINS-BROWNE *et al.* 1998). Sorotipos de STEC não-O157 tais como O111:H<sup>-</sup> e O113:H<sub>21</sub> são os mais frequentemente isolados na Austrália (BETTELHEIM, 2001; HORNITZKY *et al.* 2002).

No Japão, entre 1991 e 1995, ocorreram 29 surtos causados por O157:H<sub>7</sub>, dez surtos afetaram crianças e 19 ocorreram entre familiares (MICHINO *et al.* 1998).

No Brasil, os estudos sobre STEC ainda são incipientes. Cepas produtoras de toxina Shiga foram isoladas de rebanho bovino aparentemente saudável (CERQUEIRA *et al.* 1999; SILVA, 2002), com alta prevalência e aparentemente há predomínio de STEC não O157 (CERQUEIRA *et al.* 1999; IRINO *et al.* 2005; PIGATTO, 2004). Ainda não houve relatos de surtos associados com STEC no país e as estirpes isoladas de infecções em humanos têm sido relatadas de casos esporádicos de diarreia e raros casos de diarreia hemorrágica e de SHU (IRINO *et al.* 2002; GUTH *et al.* 2002a, 2002b, 2005; VAZ *et al.* 2004; DE TONI, 2004).

### 2.2.5. Diagnóstico Laboratorial das Infecções por STEC

O diagnóstico laboratorial das infecções causadas por STEC é dificultado pelo rápido decréscimo do número de microorganismos excretados nas fezes poucos dias após o início dos sintomas gastrintestinais e pela diversidade bioquímica e sorológica deste grupo de bactérias (KARCH *et al.* 1999). As estirpes de O157:H7 possuem uma característica bioquímica de não fermentarem o sorbitol, fato este, que foi utilizado no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e isolamento destes microrganismos, como o ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) (MARCH e RATNAM, 1986; KARCH *et al.* 1996; KONEMAN *et al.* 1997). Entretanto, estirpes de O157:H7 sorbitol positivo, já foram descritas (KARCH *et al.* 1993).

A detecção de STEC baseada somente em métodos microbiológicos tradicionais tornou-se praticamente inviável, pois a detecção de STEC não-O157 é dificultado pela ausência de propriedades bioquímicas que permitam diferenciá-las das estirpes de *Escherichia coli* da microbiota intestinal e também pela grande diversidade de sorotipos. Outro fator importante é que a caracterização do sorogrupo não indica necessariamente que o organismo produz as toxinas Shiga (KARCH *et al.* 1999; FEY *et al.* 2000; SOUZA, 2004). Dessa forma a detecção de estirpes de STEC deve ser baseada na pesquisa de toxinas Shiga ou dos genes que as codificam.

#### 2.2.5.1. Ensaio biológico

As toxinas Shiga produzem efeitos citotóxicos característicos em células Vero. Os ensaios que incorporam a neutralização da atividade citotóxica com anticorpos toxina-específicos são métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico das infecções causadas por STEC. Embora essa linhagem celular seja sensível às toxinas Shiga, ela varia na sensibilidade às formas variantes de Stx2 (STROCKBINE *et al.* 1998; KARCH *et al.* 1999). Esse método pode ser aplicado a filtrados de fezes, extratos de cultivos microbianos e colônias isoladas. É bastante sensível, mas demorado e trabalhoso, além de requerer cultivo celular o que torna pouco prático para os laboratórios de rotina (BETTELHEIM e BEUTIN, 2003).

### 2.2.5.2. Ensaio imunológicos

Os ensaios imunológicos mais freqüentemente utilizados para a detecção de STEC incluem a separação imunomagnética e imunoensaios enzimáticos. A separação imunomagnética é uma técnica de concentração e separação baseada em imunocaptura. É um método sensível, e atualmente disponível comercialmente para o isolamento de *E.coli* pertencentes aos sorogrupos O157, O111 e O26 (DE BOER; HEUVELINK, 2000).

Vários imunoensaios para a detecção de Stx foram descritos. São fáceis de realizar, não requerem equipamento especializado, mas apresentam custo elevado. Freqüentemente são utilizados extratos de culturas puras incubadas em presença de polimixina B, uma vez que parte das toxinas está associada às células.

O kit Premier EHEC, da Meridian Diagnostics, pode ser aplicado diretamente ao material fecal ou a cultura em caldo. Utiliza anticorpos monoclonais anti Stx1 e anti Stx2 para capturar as toxinas, e anticorpo policlonal antitoxina Stx1 e Stx2 marcados com peroxidase para detectar a toxina ligada. Parece ser sensível e específico, mas não é capaz de detectar a variante Stx<sub>2e</sub> e produz falso positivo com *Pseudomonas aeruginosa* (KELL, 2002).

Outro ensaio imunológico é a aglutinação passiva reversa utilizando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-Stx. Alguns kits comerciais estão disponíveis no mercado como por exemplo o VTEC-Screen, produzido pela Denka Seiken, Japão. Utiliza o tratamento das colônias de STEC com polimixina B para liberar as toxinas e caolin para remover reações inespecíficas. É sensível e específico para Stx1 e Stx2, mas reage fracamente ou não reage com variantes Stx2 como: Stx<sub>2-Ount</sub>, Stx<sub>2e</sub> e Stx<sub>2ev</sub> (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER; 2002).

### 2.2.5.3. Métodos moleculares

Os ensaios baseados em análise de DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido aplicados com sucesso no diagnóstico das STEC. Regiões específicas dos genes *stx* são selecionadas e oligonucleotídeos complementares são usados para amplificar fragmentos dos genes.

Uma variedade de sistemas é usada por diferentes laboratórios. À medida que aumenta o número das variantes das toxinas, a variedade e o número de sistemas de PCR, sem dúvida também aumentam. Variações da PCR como PCR Multiplex, PCR em Tempo Real, PCR combinado com ELISA, também estão sendo utilizados. A maioria destas técnicas é usada para determinar a presença de STEC na amostra, sem que os microorganismos tenham sido isolados.

Estas técnicas permitem ainda uma avaliação sobre os fatores de virulência presentes nas diferentes estirpes. Entretanto, por serem de alto custo e a necessidade de equipamentos especiais, o seu uso em laboratórios de pequeno porte ainda é limitado (BETTELHEIM e BEUTIN, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em bovinos de corte do Estado do Paraná e caracterizar as estirpes de acordo com os sorotipos e fatores associados com virulência

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a prevalência de STEC em bovinos de corte procedentes de 41 municípios do Estado do Paraná.
- Determinar os sorotipos das estirpes de STEC isoladas.
- Determinar a presença dos genes de virulência *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *ehxA*, *eaeA* e *saa* nas estirpes isoladas.
- Determinar os subtipos de genes *stx<sub>2</sub>* nas estirpes isoladas por PCR-RFLP.
- Avaliar o desempenho do imunoensaio VTEC-Screen para a detecção de toxina Shiga nas estirpes isoladas.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostra**

Para o cálculo do tamanho da amostra mínima, foi utilizado o programa EPI info versão 6.0, programa de processamento de texto, banco de dados e estatística para Saúde Pública do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), do Governo Federal dos EUA. Foi estabelecido um nível de confiança de 95% e um erro tolerável de 2% para uma população estimada de 4000 animais. Definidos estes valores o tamanho da amostra mínima calculado foi de 93 animais.

A escolha das unidades de amostra foi obtida por amostragem sistemática na linha de abate. O intervalo de seleção foi calculado pelo número de animais a serem abatidos na data de coleta dividido por cinco (número de amostras a serem coletadas em cada data de coleta). A determinação do início casual foi definida através de amostragem aleatória simples de um número do intervalo de seleção previamente calculado (SILVA, 2002).

Foram analisadas amostras fecais de 107 bovinos sadios provenientes dos seguintes municípios do Estado do Paraná: Adrianópolis, Arapoti, Ariranha do Ivaí, Balsa Nova, Bocaiúva do Sul, Candói, Carlópolis, Cerro Azul, Curiúva, Dr. Ulisses, Guaraniaçu, Guarapuava, Imbaú, Iretama, Jaboti, Jordão, Laranjeiras do Sul, Luiziana, Maria Helena, Mato Rico, Marquinho, Nova Fátima, Nova Laranjeiras, Palmeira, Palmital, Paranavaí, Piraí do Sul, Pitanga, Planaltina, Ponta Grossa, Reserva, Rio Branco do Sul, Salto do Itararé, Santana do Itararé, São José da Boa Vista, Sapopema, Siqueira Campos, Socavão, Tibagi, Tomazina e Turvo.

#### **4.1.1. Coleta das amostras**

As amostras fecais (swabs retais) foram coletadas em um abatedouro fornecedor de carne da cidade de Curitiba, durante o período de 14/05/2001 a 01/08/2001. As amostras foram transportadas até o laboratório em meio de Cary-Blair e plaqueadas em no máximo 6 horas após a coleta.

## 4.2. Triagem para *Escherichia coli*

As amostras fecais foram semeadas em Ágar MacConkey-Sorbitol (SMAC; OXOID) e incubadas à 35°C, durante 24 horas. Após este período foram selecionadas, de cada amostra, cerca de 10 colônias sorbitol positivas e sorbitol negativas que foram inoculadas nos meios de EPM, MILI e Ágar Nutriente. Foram selecionadas as colônias que apresentaram nos dois primeiros meios as seguintes reações: fermentação de glicose com produção de gás (+), desaminação de L-triptofano (-), atividade de urease (-), produção de H<sub>2</sub>S (-), formação de indol (+), motilidade (+) e descarboxilação do aminoácido lisina (+). O crescimento em ágar nutriente foi utilizado para o preparo de estoques das bactérias identificadas como *Escherichia coli*. As bactérias foram inoculadas em ágar gelose para conservação de cepas e mantidas à temperatura ambiente.

## 4.3. Ensaio de citotoxicidade em células Vero

As colônias isoladas de *Escherichia coli* foram avaliadas quanto à capacidade de produzir efeito citotóxico utilizando o ensaio de citotoxicidade em células Vero, realizado segundo KARMALI *et al.* (1985). Foram inoculadas em tubos contendo 2 ml de caldo Penassay (Antibiotic Medium nº.3, DIFCO) e incubadas à 37°C durante 18-24 horas. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos à 4°C, os sobrenadantes foram filtrados em membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm e mantidos a -20°C até a realização do teste. Sobrenadantes estéreis foram depositados na monocamada de células Vero e incubados em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As leituras, para verificar o efeito citotóxico, foram realizadas em microscópio óptico invertido após 24 e 48 horas.

Como controle positivo foi utilizada STEC O157:H7 estirpe EDL 933 e como controle negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 4.4. Determinação dos sorotipos

A caracterização antigênica das STEC foi realizada no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) utilizando anti-soros somáticos (O1-O181) e flagelares (H1-H56) preparados com cepas de referência obtidas junto ao “International Reference Centre for *Escherichia/Klebsiella*”, Copenhagen, Dinamarca. A sorotipagem foi realizada de acordo com EWING (1986); ORSKOV e ORSKOV (1984).

#### 4.5. Ensaio para detecção da enterohemolisina

A pesquisa da enterohemolisina foi realizada segundo BEUTIN *et al.* (1989). Todas as estirpes de STEC foram semeadas nas placas contendo ágar sangue (5%), preparado com eritrócitos de carneiro lavados em tampão fosfato, e acrescido de cloreto de cálcio (10mM). As estirpes EDL 933, U4-41 e C4170, caracterizadas pela produção da enterohemolisina,  $\alpha$  hemolisina e não produtora de hemolisina, respectivamente, foram utilizadas como controles. As leituras foram realizadas após 3-6 horas e 18-24 horas de incubação a 37°C. Foram consideradas como enterohemolíticas aquelas que produziam um pequeno halo turvo após um período de incubação de 18-24h.

#### 4.6. Verificação da expressão de Stx através de imunoensaio

A expressão de Stx foi também verificada utilizando o kit comercial VTEC-Screen (Denka-Seiken, Japan). O VTEC-Screen é utilizado para a detecção de Stx1 e Stx2 em culturas mistas e isolados de *Escherichia coli*. É um ensaio de aglutinação passiva reversa. Partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-Stx1 e anti-Stx2, aglutinam e depositam-se difusamente no fundo de placas de micro titulação quando em contato com amostras que contém Stx. Na ausência de Stx as partículas de látex depositam-se formando um botão, facilmente distinguível das amostras positivas. As amostras são analisadas em paralelo frente a um controle negativo (partículas de látex) e controles positivos (toxina Stx1 e Stx2 de títulos conhecidos) fornecidos pelo fabricante. Um resultado positivo é indicado pela diferença de pelo menos 2 diluições entre os títulos de aglutinação com látex sensibilizado e látex

controle. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, até a diluição de 1:16. Títulos inferiores a 1:4 foram considerados como negativos. Como controle positivo foi utilizada a STEC O157:H7 EDL 933.

#### **4.7. Caracterização genotípica das STEC**

##### 4.7.1. Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método da fervura segundo OLSVICK e STROCKBINE (1993). Uma porção da região primária do crescimento em SMAC foi suspensa em 500 µL de água destilada estéril e submetida à fervura por 20 minutos, para liberação do DNA. Após resfriar, o material foi centrifugado a 14000 rpm durante um minuto, e o sobrenadante transferido para outro tubo estéril e mantido à -20°C.

##### 4.7.2. PCR-Multiplex

Para caracterizar genotipicamente as STEC, a presença ou não dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* e *saa*, foi determinada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores cujas seqüências estão indicadas na TABELA 1.

TABELA 1 – INICIADORES UTILIZADOS PARA PCR MULTIPLEX\*

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência (5' → 3')</b>	<b>Amplicon</b>
<i>Saa</i> F	CCTCACATCTTCTGCAAATACC	119 pb
<i>Saa</i> R	GTTGTCCTGCAGATTTTACCATCCAATGGACATG	
<i>stx</i> <sub>1</sub> F	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC	180 pb
<i>stx</i> <sub>1</sub> R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	
<i>stx</i> <sub>2</sub> F	GGCACTGTCTGAACTGCTCC	255 pb
<i>stx</i> <sub>2</sub> R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
<i>eaeA</i> F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384 pb
<i>eaeA</i> R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>ehxA</i> F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534 pb
<i>ehxA</i> R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

\*Retirado de PATON e PATON (1998b, 2002).

Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Invitrogen.

As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 3,0 µL (2-10 ng) de DNA; 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen 5 U/µL); 2,5 µL de Tampão de Taq (Invitrogen) 10X; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50Mm; 2,0 µL da mistura de iniciadores (300nM cada); 1,0 µL de dNTP (Eppendorf) 5 mM. O programa utilizado foi o seguinte: 1 ciclo a 94°C durante 4 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 64°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguidos de 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. A amplificação das amostras foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Foram utilizados como controle positivo a STEC O157:H7 EDL 933, e como controle negativo, a *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 4.7.2.1. Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (BIO RAD) a 2% em TBE 1X (Tris 89mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM) (AUSUBEL *et al*, 2000). As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema de eletroforese horizontal (Horizon 58, Life Technologies), a 36 V durante 3 horas. Os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídio 0,5

µg/mL, visualizados em transiluminador ultravioleta (Ultralum) e as imagens registradas com câmera digital.

#### 4.7.3. Subtipagem dos genes *stx*<sub>2</sub> por PCR-RFLP

No ensaio de PCR-RFLP fragmentos dos genes *stx* foram tratados com endonucleases de restrição gerando produtos que permitem caracterizar alelos de *stx*<sub>2</sub>, como descrito em BASTIAN *et al.* (1998). O DNA foi extraído como descrito no item 4.7.1.

##### 4.7.3.1. Amplificação dos genes *stx*

Fragmentos dos genes *stx* foram amplificados utilizando os iniciadores descritos por LIN *et al* (citado por BASTIAN *et al*, 1998), cujas seqüências estão indicadas na TABELA 2.

TABELA 2 – INICIADORES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR-RFLP\*

Iniciador	Seqüência (5' → 3')	Amplicon
LIN F	GAACGAAATAATTTATATGT	900pb
LIN R	TTTGATTGTTAC(A/C)GTCAT	

\*Citados em BASTIAN *et al.* (1998). O iniciador LinR foi modificado (PIGATTO, 2004) para a detecção de outros variantes.

Esses iniciadores permitem a amplificação dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> e seus variantes. Anelam nas regiões que compreendem os nucleotídeos +280 a 300 (LINF) e 1138 a 1155 (LINR) do gene *stx*<sub>2</sub>, gerando fragmentos de aproximadamente 900 pb.

A PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 3,0 µL (2-10 ng) de DNA, 0,3 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen 5U/ µL), 2,5 µL de tampão de Taq (Invitrogen) 10X, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1,0 µL de dNTP (Eppendorf) 5mM e 1,0 µL de oligonucleotídeos iniciadores LIN F e LIN R (10 pmol/µL). A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient – (Eppendorf), utilizando o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos a 94°C

durante 1 minuto, 42°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; seguidos de 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. A presença dos produtos de amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (BIO RAD) a 1% (item 4.7.2.1).

#### 4.7.3.2 Clivagem dos produtos de PCR com endonucleases de restrição

Para a identificação dos genes *stx* segundo BASTIAN et al. (1998), o DNA amplificado deve ser tratado com as endonucleases de restrição *Accl* e *HincII*. Neste trabalho *Accl* foi substituída pelo seu isosquisômero *XmI*. Dez microlitros dos produtos de PCR foram incubados com 3 unidades das enzimas *XmI* e *HincII* (Fermentas) em tampão fornecido pelo fabricante, em volume final de 20 µL, por aproximadamente 12 horas a 37°C. Os fragmentos gerados foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, a 36V durante 4 horas, conforme descrito no item 4.7.2.1.

A interpretação do padrão de bandas gerado foi feito como indicado na TABELA 3.

TABELA 3 - PERFIL DE PCR-RFLP PARA OS GENES *stx* \* .

<b>Gene <i>stx</i></b>	<b><i>HincII</i> (pb)</b>	<b><i>Accl (XmI)</i> (pb)</b>
<i>stx</i> <sub>1</sub>	705, 158, 32	768, 127
<i>stx</i> <sub>1v</sub>	705, 158, 32	768, 127
<i>stx</i> <sub>2</sub>	555, 262, 62	544, 351
<i>stx</i> <sub>2c</sub>	555, 324, 16	544, 351
<i>stx</i> <sub>2vha</sub>	555, 324, 16	544, 351
<i>stx</i> <sub>2vOX393</sub>	555, 324, 16	544, 351
<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	555, 340	544, 351
<i>stx</i> <sub>2vO111</sub>	880, 15	544, 351
<i>stx</i> <sub>2vOX392</sub>	880, 15	544, 351
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	555, 340	900
<i>stx</i> <sub>2ev</sub>	521, 374	900

\*Retirado de BASTIAN et al (1998). Tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

#### **4.8 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica para Windows versão 5.5 e para o teste de Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) o programa RxC (MILLER, 1997).



## 5 RESULTADOS

### 5.1. Triagem para *Escherichia coli*

Das 107 culturas fecais realizadas em SMAC foram selecionadas 647 colônias que apresentaram características compatíveis com *Escherichia coli* representando em média 6 colônias por amostra.

### 5.2. Ensaio de citotoxicidade em células Vero:

As 647 colônias de *Escherichia coli* foram analisadas utilizando o ensaio de citotoxicidade em células Vero como descrito no item 4.3. Foi observada a atividade citotóxica em 311 (48%) das 647 colônias analisadas. Estirpes de *Escherichia coli* confirmadas geneticamente como STEC (*stx1* ou *stx2*, ou *stx1/stx2*) foram encontradas em 61 das 107 amostras fecais, indicando que 57% dos animais analisados eram portadores dessa bactéria. A presença de STEC foi detectada em bovinos provenientes de 30 municípios. A distribuição e a frequência dos isolados de STEC está mostrada na TABELA 4 e FIGURA 2 e a localização geográfica das cidades, na FIGURA 3

TABELA 4 - FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE STEC DE ACORDO COM AS MICRO-REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ.

<b>Micro-Região</b>	<b>Isolados</b>	<b>Frequência</b>
06. Cascavel	3	4,7%
10. Região Metropolitana de Curitiba	7	11,0%
16. Guarapuava	15	23,4%
17. Ibaiti	1	1,6%
19. Ivaiporã	1	1,6%
27. Umuarama	5	7,8%
29. Pitanga	3	4,7%
30. Ponta Grossa	4	6,2%
35. Telêmaco Borba	5	7,8%
37. Paranavaí	5	7,8%
39. Wenceslau Braz	15	23,4%

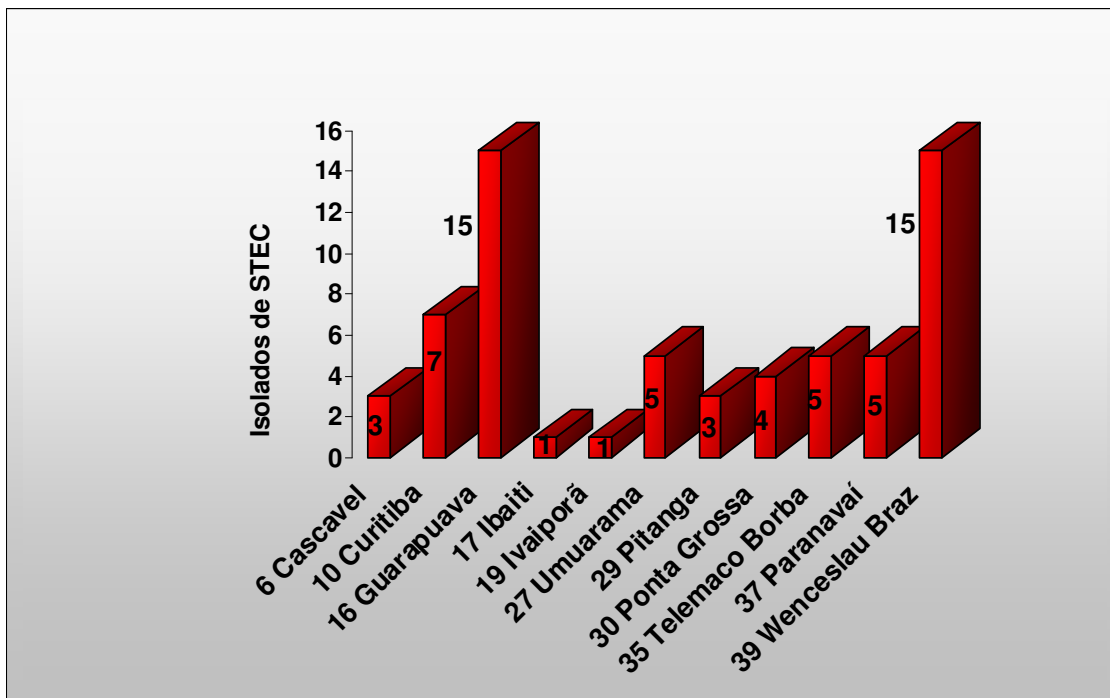
FIGURA 2 - OCORRÊNCIA DE STEC NO ESTADO DO PARANÁ POR REGIÃO GEOGRÁFICA.



As micro-regiões do Estado estão indicadas por números no mapa. Em vermelho as micro-regiões nas quais a presença de STEC foi detectada em bovinos.

Na Região Oeste, STEC foi encontrada na cidade de Guaraniaçu micro-região de Cascavel (06); na Região Metropolitana de Curitiba (10), nas cidades Bocaiúva do Sul, Cerro Azul, Curiúva, Doutor Ulisses; na Região Centro-Sul, micro-região de Guarapuava (16) nas cidades Guarapuava, Jordão, Laranjeiras do Sul, Marquinho e Nova Laranjeiras; e na micro-região de Pitanga (29), em Mato Rico e Pitanga; na Região Noroeste, micro-região de Umuarama (27) nas cidades de Maria Helena e Planaltina, e em Paranavaí na micro-região de Paranavaí (37); na Região do Norte-Pioneiro, micro-região de Wenceslau Braz (39), nas cidades de Carlópolis, Jaboti, Santana do Itararé, Sapopema, São José da Boa Vista, Siqueira Campos e Tomazina; micro-região de Ibaiti (17), na cidade de Palmital; na Região Norte Central, micro-região de Ivaiporã (19), na cidade de Iretama; na Região Centro-Oriental, micro-região de Ponta-Grossa (30), nas cidades de Palmeira, Piraí do Sul e Ponta Grossa, e na micro-região de Telêmaco Borba (35) nas cidades Imbaú, Reserva e Tibagi.

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE STEC POR MICRO-REGIÕES



Na linha horizontal estão descritas as micro-regiões onde foram encontradas STEC.

Na linha vertical estão descritos os números de isolados de STEC.

## 5.2 Classificação Sorológica das STEC

Sessenta e quatro estirpes caracterizadas como STEC, foram analisadas para a identificação dos antígenos somáticos “O” e flagelares “H”. Trinta e um diferentes sorotipos foram encontrados e estão descritos na TABELA 5. Com exceção de 3 amostras, nas quais estirpes de STEC pertencendo a diferentes sorotipos foram encontradas, nas demais apenas uma colônia foi selecionada para dar continuidade aos experimentos.

TABELA 5 - SOROTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE STEC E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS.

Sorotipo	Número de estirpes	Frequência (%)
ONT:H7	07	10,9
O82:H8	05	7,8
O22:H8	05	7,8
ONT:H8	04	6,2
O116:H21	04	6,2
O174:H21	03	4,6
ONT:H21	03	4,6
<b>O152:H8</b>	02	3,1
O74:H42	02	3,1
<b>O176:H18</b>	02	3,1
O177:H <sup>-</sup>	02	3,1
ONT:H25	02	3,1
O156:H21	02	3,1
O163:H19	02	3,1
O113:H21	02	3,1
ONT:H2	02	3,1
O110:H2	01	1,6
<b>O175:H21</b>	01	1,6
ONT:H19	01	1,6
O88:H25	01	1,6
O91:H21	01	1,6
O79:H14	01	1,6
O178:H19	01	1,6
O139:H19	01	1,6
ONT:H18	01	1,6
O15:H27	01	1,6
ONT:H <sup>-</sup>	01	1,6
O163: H <sup>-</sup>	01	1,6
ONT:HNT	01	1,6
ONT:H16	01	1,6
O157:H7#	01	1,6

**ONT:** antígeno "O" não tipável. **HNT:** antígeno "H" não tipável.

# estirpe isolada por SILVA (2002) e incluída nos demais ensaios.

Sorotipos destacados em negrito ainda não foram descritos na literatura, associados a STEC.

#### 5.4. Produção de Enterohemolisina

A presença de enterohemolisina foi detectada em 39 (61%) das estirpes de STEC.

### 5.5. Detecção de Stx pelo imunoensaio VTEC-Screen

Foram avaliadas 62 estirpes quanto à produção de Stx através do imunoensaio VTEC-Screen. Dessas, apenas 48 (77,4%) apresentaram reação positiva: 43 com título  $\geq 1:16$ , e 5 com título igual a 1:8. Houve 22,6% de resultados falsos negativos. Entre as 14 estirpes cujos resultados foram interpretados como negativos para a produção de Stx, de acordo com os critérios recomendados pelo fabricante, todas apresentaram reações fracas: 5 apresentaram título igual a 1:4 e nove título igual a 1:2 (TABELA 8).

Considerando as amostras que contém apenas variantes de *stx*<sub>2</sub> a positividade para variantes de Stx foi de 8/16 (50%), sendo significativamente diferente ( $\chi^2$ ;  $P < 0,004$ ) da obtida para Stx1 e Stx2 (34/37; 91,8%). Portanto, o VTEC-Screen não foi capaz de detectar cerca de 50% das variantes de Stx testadas.

### 5.6. Caracterização genotípica das STEC

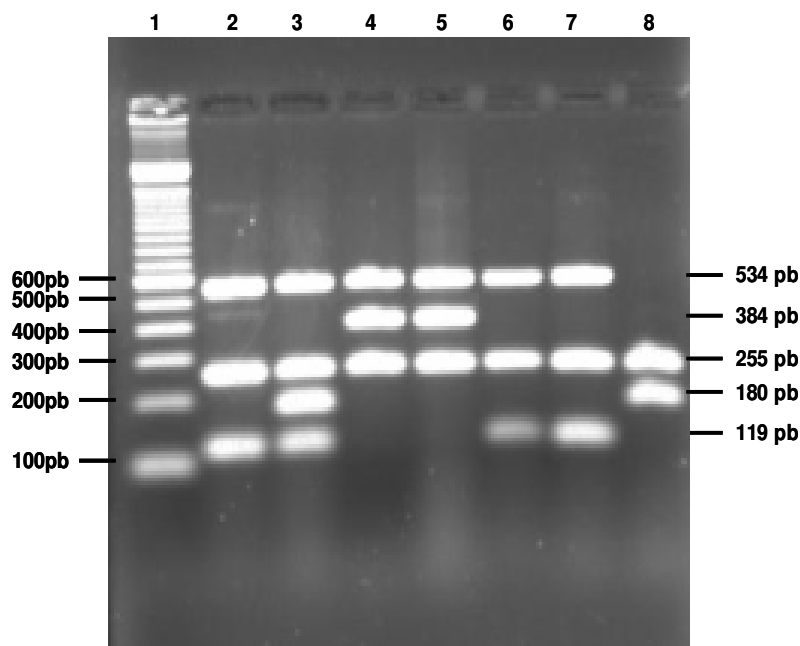
Sessenta e quatro isolados de *Escherichia coli* que apresentaram efeito citotóxico em células Vero (uma colônia por amostra, com exceção das amostras 7, 9 e 65 nas quais 2 diferentes sorotipos de STEC foram identificados) foram analisados através de PCR-Multiplex para verificar a presença dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* e *saa*. O gene *stx*<sub>1</sub> foi encontrado isoladamente em apenas 2 (3,1%) estirpes, *stx*<sub>2</sub> em 35 (54,7%); a presença simultânea dos dois genes foi detectada em 27 (42,2%) estirpes. O gene *ehxA* foi detectado em 46 (71,9%) estirpes, enquanto que o fenótipo enterohemolítico foi observado em apenas 39 delas. Os genes *saa* e *eaeA* foram detectados em 40 (62,5%) em 04 estirpes (6,2%), respectivamente, e sempre associados ao gene *ehxA*.

Os genótipos detectados nas estirpes de STEC estão indicados na TABELA 6 e FIGURA 6.

TABELA 6 - GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NAS ESTIRPES DE STEC.

Genótipo	N	Frequência (%)
<i>stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA saa</i>	21	32,8
<i>stx<sub>2</sub> ehxA.saa</i>	17	26,6
<i>stx<sub>2</sub></i>	14	21,9
<i>stx<sub>1</sub>stx<sub>2</sub></i>	04	6,25
<i>stx<sub>2</sub>.eaeA.ehxA</i>	04	6,25
<i>stx<sub>1</sub> ehxA.saa</i>	02	3,1
<i>stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA</i>	2	3,1

**N:** número de estirpes de STEC

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENES *saa*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *eaeA* e *ehxA* ENTRE AS ESTIRPES DE STEC.

Representação de gel de agarose contendo produtos de amplificação de PCR-Multiplex para os genes *saa*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *eaeA* e *ehxA*, indicados pela presença de fragmentos de DNA de 119 pb; 180 pb, 258 pb, 380 pb and 542 pb, respectivamente. A eletroforese foi realizada em agarose 2% em tampão TBE 1X, 36V, durante 3 horas. O gel foi corado durante 20 minutos em brometo de etídeo 0,5µg/mL, observado em transiluminador UV (302 nm) e fotografado.

Linha 1. Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen).

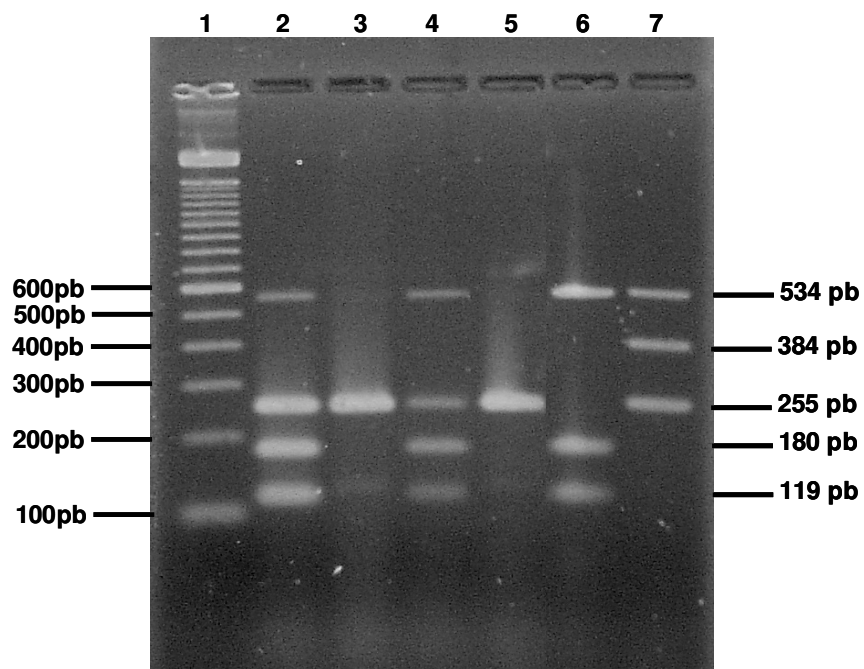
Linhas 2, 6 e 7: perfil eletroforético representativo do genótipo *saa stx<sub>2</sub> ehxA* (amostras: 10, 53 e 58).

Linha 3: perfil eletroforético representativo do genótipo *saa stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA* (amostra 33).

Linhas 4 e 5: perfil eletroforético representativo do genótipo *stx<sub>2</sub> eaeA ehxA* (amostras 43 e 45).

Linha 8: perfil eletroforético representativo do genótipo *stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub>* (amostra 66).

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENES *saa*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *eaeA* e *ehxA* ENTRE AS ESTIRPES DE STEC.



Representação de gel de agarose contendo produtos de amplificação de PCR-Multiplex para os genes *saa*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *eaeA* and *ehxA*, indicados pela presença de fragmentos de DNA de 119 pb; 180 pb, 258 pb, 380 pb and 542 pb, respectivamente. A eletroforese foi realizada em agarose 2% em tampão TBE 1X, 36V, durante 3 horas. O gel foi corado durante 20 minutos em brometo de etídeo 0,5 µg/mL, observado em transiluminador UV (302 nm) e fotografado.

Linha 1. Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen).

Linhas 2 e 4: perfil eletroforético representativo do genótipo *saa stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA* (amostras 50 e 98).

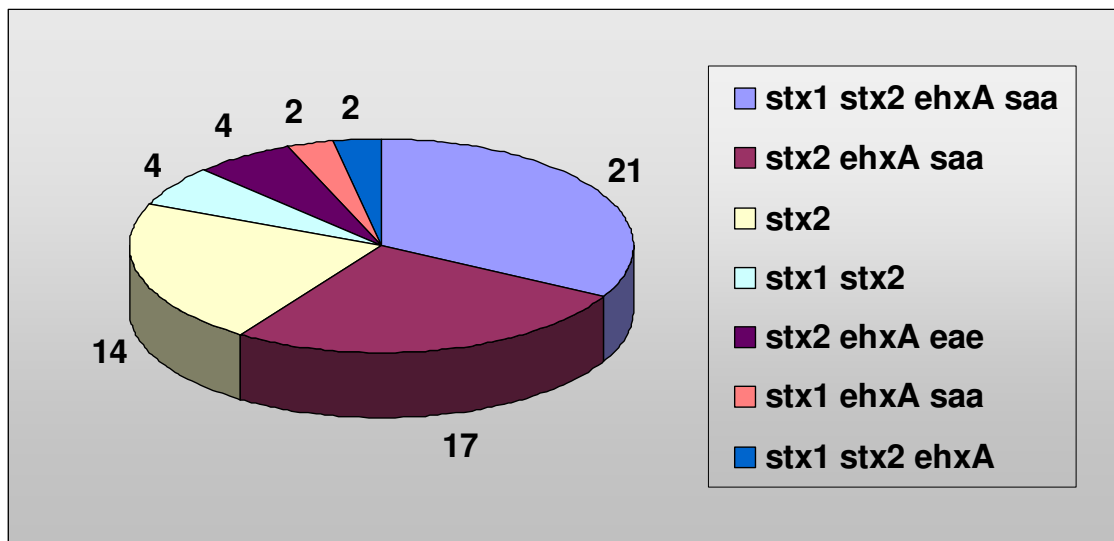
Linhas 3 e 5: perfil eletroforético representativo do genótipo *stx<sub>2</sub>* (amostras 21 e 85).

Linha 6: perfil eletroforético representativo do genótipo *saa stx<sub>1</sub> ehxA* (amostra 91).

Linha 7: perfil eletroforético representativo do genótipo *stx<sub>2</sub> eaeA ehxA* (amostra 104).

Os resultados de PCR-Multiplex indicaram a presença de 7 perfis genéticos diferentes nas estirpes de STEC considerando os genes *saa*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA* e *ehxA*. A FIGURA 6 representa a freqüência dos diferentes genótipos nas STEC.

FIGURA 6 - GENÓTIPOS DETECTADOS NAS ESTIRPES DE STEC



N = 64, os números representam as estirpes de STEC testadas.

### 5.7. Subtipagem dos genes *stx*<sub>2</sub> por PCR-RFLP

O método de subtipagem dos genes *stx* por PCR-RFLP proposto por BASTIAN et al. (1998), permite distinguir entre os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub> / *stx*<sub>2vha</sub> / *stx*<sub>2OX393</sub>, *stx*<sub>2vhb</sub>, *stx*<sub>2vO111</sub> / *stx*<sub>2vO392</sub>, *stx*<sub>2e</sub> e *stx*<sub>2ev</sub>. (TABELA 3). Os alelos de *stx*<sub>1</sub> não são diferenciados, assim como também não é possível distinguir entre os genes *stx*<sub>2vO111</sub> e *stx*<sub>2vO392</sub> e *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2vha</sub> e *stx*<sub>2OX393</sub>. Neste trabalho os alelos *stx*<sub>2c</sub> / *stx*<sub>2vha</sub> e *stx*<sub>2OX393</sub> foram designados como *stx*<sub>2c</sub>.

Os resultados obtidos, considerando a presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>, estão indicados na TABELA 7.

Em 11 estirpes a amplificação de genes do tipo *stx*<sub>2</sub>, confirmada por PCR-Multiplex, não ocorreu com os iniciadores LINR e LINF, o que não permitiu determinar o alelo presente nessas STEC. A presença dos alelos *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2vhb</sub> e *stx*<sub>2vO111</sub> / *stx*<sub>2vO392</sub> foi detectada nas estirpes de STEC analisadas (TABELA 3). Esses genes foram encontrados isoladamente ou associados com outros alelos,



com exceção do alelo *stx*<sub>2vO111</sub> / *stx*<sub>2vO392</sub>, que só foi detectado isoladamente. O gene que apresentou maior frequência entre as estirpes de STEC foi *stx*<sub>2</sub> (*stx*<sub>2-EDL933</sub>) detectado em 34 (64%) das 51 estirpes analisadas por PCR-RFLP.

TABELA 7 – SUBTIPOS DE GENES *stx*<sub>2</sub> IDENTIFICADOS POR PCR-RFLP ENCONTRADOS ISOLADAMENTE OU EM ASSOCIAÇÃO COM OUTROS GENES

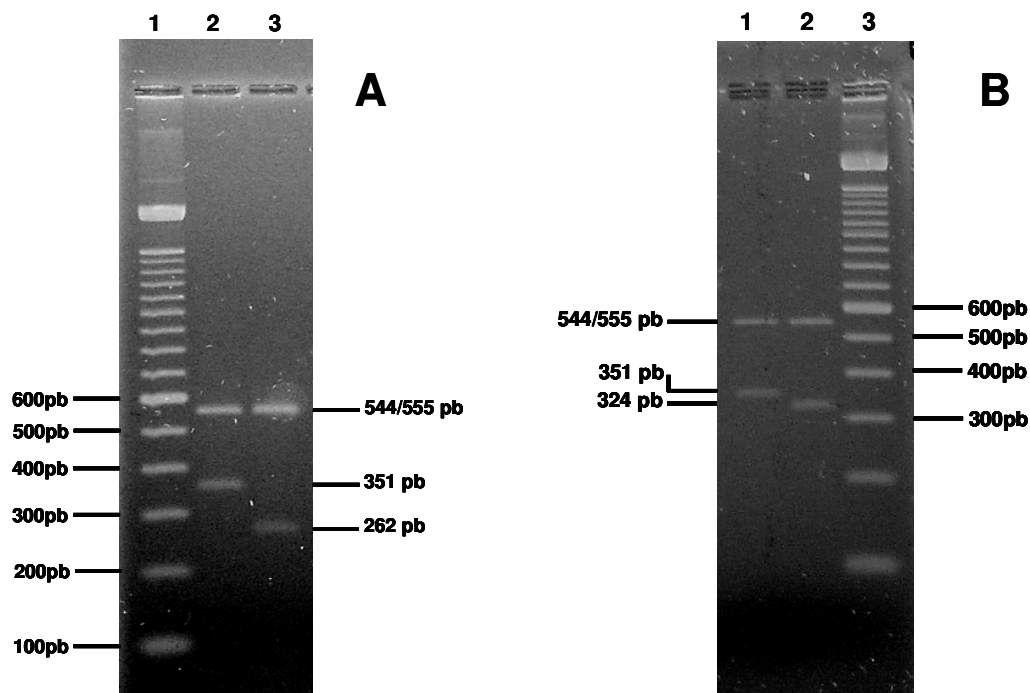
<b>N</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Estirpes de STEC</b>
01	<i>stx</i> <sub>2</sub>	15
01	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	07
01	<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	01
01	<i>stx</i> <sub>2vO111</sub> / <i>stx</i> <sub>2vOX392</sub>	01
02	<i>stx</i> <sub>1</sub> <i>stx</i> <sub>2</sub>	14
02	<i>stx</i> <sub>1</sub> <i>stx</i> <sub>2c</sub>	03
02	<i>stx</i> <sub>1</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	04
02	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2c</sub>	01
02	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	01
02	<i>stx</i> <sub>2c</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	01
03	<i>stx</i> <sub>1</sub> <i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	03

**N:** número de genes *stx* por estirpe.

\*Em 11 estirpes não houve amplificação dos genes *stx*<sub>2</sub> utilizando os iniciadores LINF e LINR.

As FIGURAS 7 a 9 representam os alelos detectados por PCR-RFLP nas estirpes analisadas.

FIGURA 7 - PCR-RFLP DOS GENES *stx* MOSTRANDO PERFIS  
COMPATÍVEIS COM *stx*<sub>2</sub> (*stx*<sub>2</sub>-EDL933) E *stx*<sub>2c</sub>



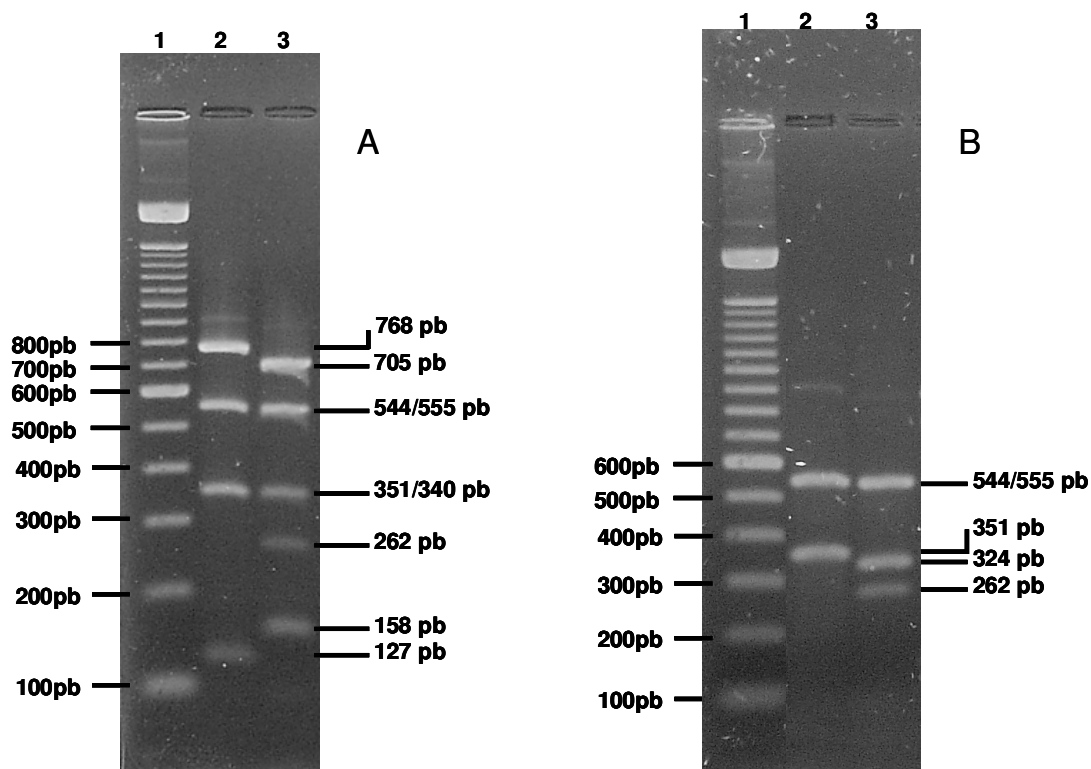
Representação de gel de agarose contendo produtos de PCR-RFLP para a identificação de genes *stx* (item 4.7.3 em Materiais e Métodos) A eletroforese foi realizada em agarose 2% em tampão TBE 1X, 36V, durante 4 horas. O gel foi corado durante 20 minutos em brometo de etídeo 0,5 µg/mL, observado em transiluminador UV (302 nm) e fotografado.

A. Linha 1. Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen). Linha 2: Dna da estirpe 58 digerido com a endonuclease de restrição *Xmi*I, fragmentos de 544 e 351 pb; Linha 3: DNA da estirpe 58 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 555, 262 e 62\* pb. Perfil compatível com o esperado para o gene *stx*<sub>2</sub> (*stx*<sub>2</sub> - EDL933).

B. Linha 1: DNA da estirpe 81 digerido com a com a endonuclease de restrição *Xmi*I, fragmentos de 544 e 351 pb; Linha 2: DNA da estirpe 81 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 555, 324 e 16\* pb. Linha 3. Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen). Perfil compatível com o esperado para o gene *stx*<sub>2c</sub>.

\*fragmentos não visualizados nas condições utilizadas para a eletroforese.

FIGURA 8 - PCR-RFLP DOS GENES *stx* MOSTRANDO PERFIS COMPATÍVEIS COM *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2vnb</sub> e *stx*<sub>2c</sub>



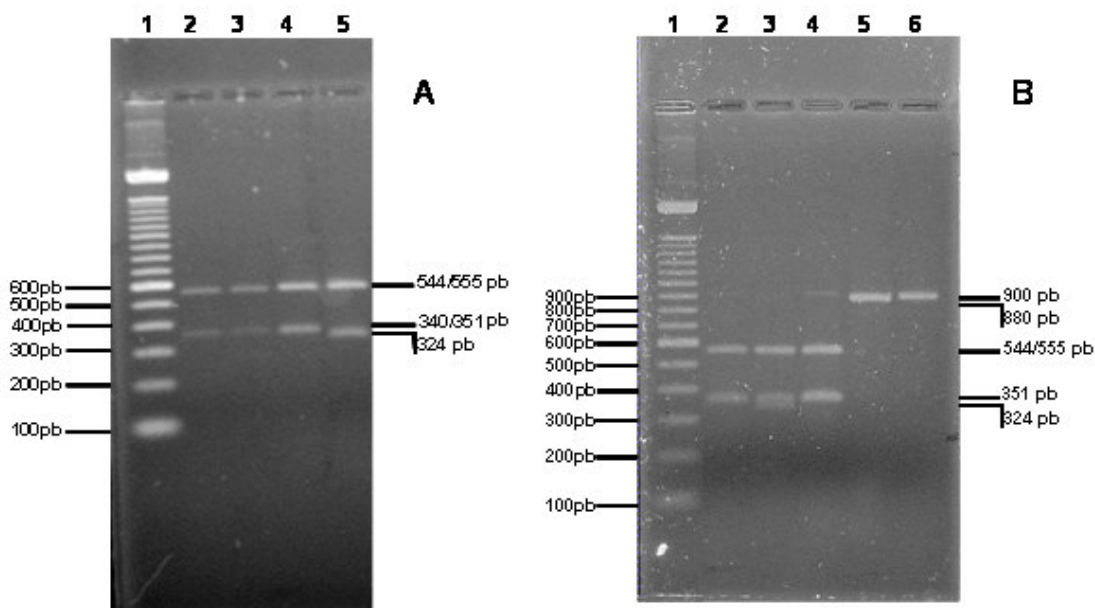
Representação de gel de agarose contendo produtos de PCR-RFLP para a identificação de genes *stx* (item 4.7.3 em Materiais e Métodos) A eletroforese foi realizada em agarose 2% em tampão TBE 1X, 36V, durante 4 horas. O gel foi corado durante 20 minutos em brometo de etídeo 0,5 µg/mL, observado em transiluminador UV (302 nm) e fotografado.

A. Linha 1. Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen). Linha 2: DNA da estirpe 7-4 digerido com a endonuclease de restrição *Xmi*I, fragmentos de 768, 544, 351 e 127 pb (compatível com a presença de genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>); Linha 2: DNA da estirpe 7-4 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 705, 555, 340, 262, 158, 62\* e 32\* pb. O perfil observado nas linhas 2 e 3 é compatível com o esperado para os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>2vnb</sub> presentes na mesma estirpe.

B. Linha 1: Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen). Linha 2: DNA da estirpe 43 digerido com a endonuclease de restrição *Xmi*I, fragmentos de 544 e 351 pb; Linha 3: DNA da estirpe 43 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 555, 324, 262, 62\* e 16\* pb. O perfil observado nas linhas 2 e 3 é compatível com o esperado para a presença simultânea dos genes *stx*<sub>2c</sub> e *stx*<sub>2</sub> em uma estirpe.

\* fragmentos não visualizados nas condições utilizadas para eletroforese.

FIGURA 9 - PCR-RFLP DOS GENES *stx* MOSTRANDO PERFIS COMPATÍVEIS COM *stx*<sub>2v**hb**</sub>, *stx*<sub>2c</sub> E *stx*<sub>2vO111</sub> / *stx*<sub>2vOX392</sub>



Representação de gel de agarose contendo produtos de PCR-RFLP para a identificação de genes *stx* (item 4.7.3 em Materiais e Métodos) A eletroforese foi realizada em agarose 2% em tampão TBE 1X, 36V, durante 4 horas. O gel foi corado durante 20 minutos em brometo de etídeo 0,5 µg/mL, observado em transiluminador UV (302 nm) e fotografado.

A. Linha 1. Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen). Linhas 2 e 4: DNA das estirpes 95 e 103 digerido com a endonuclease de restrição *Xmi*I, fragmentos de 544 e 351 pb; Linha 3: DNA da estirpe 95 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 555 e 340 pb. Linha 5: DNA da estirpe 103 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 555, 324 e 16\* pb. O perfil observado nas linhas 2 e 3 é compatível com o esperado para o gene *stx*<sub>2v**hb**</sub>; e o das linhas 4 e 5 com o gene *stx*<sub>2c</sub>.

B. Linha 1: Marcador de massa molecular 100pb (Invitrogen). Linhas 2 e 4: DNA das estirpes 86 e 101 digerido com a endonuclease de restrição *Xmi*I, fragmentos de 544 e 351 pb; Linha 3: DNA da estirpe 86 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 555, 340, 324 e 16\* pb. Linha 5: DNA da estirpe 101 digerido com a endonuclease de restrição *Hinc*II, fragmentos de 880 e 15\*pb. Linha 6: produto de PCR da estirpe 101 não tratado com endonucleases de restrição. O perfil observado nas linhas 2 e 3 é compatível com o esperado para a presença simultânea dos genes *stx*<sub>2c</sub>-e *stx*<sub>2v**hb**</sub> em uma estirpe; o das linhas 4, 5 e 6 é compatível com a presença do gene *stx*<sub>2O111</sub> / *stx*<sub>2vOX392</sub>.

\*fragmentos não visualizados nas condições utilizadas para a eletroforese.

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DAS STEC E REGIÃO DE OCORRÊNCIA.

Amostra	Sorotipo	Tipo de gene <i>stx</i>	Gene <i>ehxA</i>	Gene <i>eaeA</i>	Gene <i>saa</i>	Vtec Screen*	Subtipo de gene <i>stx</i> <sub>2</sub>	R
7 <sub>2</sub>	O110:H2	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	10
7 <sub>4</sub>	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	10
9 <sub>1</sub>	O82:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	NA	27
9 <sub>4</sub>	O152:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	27
10	O82:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16
11	O74:H42	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	16
12	O116:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16
14	O22:H8	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
15	ONT:H8	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	39
16	O174:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:8	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	16
17	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	19
21	ONT:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	39
22	O174:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	NA	06
28	O152:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16
33	O176:H18	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
34	ONT:21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:4	NA	39
39	O175:H21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	27
40	O116:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	27
43	O177:H-	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	+	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2c</sub>	16
45	ONT:H25	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	+	-	1:4	<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	10
47	ONT:H19	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	30
49	O88:H25	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	16
50	O91:21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16
51	O82:H8	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	NA	29
52	ONT:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	37
53	ONT:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	37
54	O156:H21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	NT	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	37
55	O22:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:4	<i>stx</i> <sub>2</sub>	06
56	O82:H8	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	29
58	O116:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:4	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
62	O163:H19	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	35
65 <sub>1</sub>	O79:H14	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	35
65 <sub>2</sub>	O116:H21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	35
66	O113:H21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:16	NA	17
68	ONT:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	NT	NA	16
69	O22:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	06
70	O178:H19	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	27
71	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	10
72	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	10
74	O163:H19	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	10
75	O176:H18	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
76	O139:H19	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16

78	O82:H8	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16
80	O156:H21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	10
81	ONT:H25	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	35
83	ONT:H18	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	NA	30
85	O22:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
86	ONT:H2	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	<i>stx</i> <sub>2c</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	29
87	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub>	+	-	-	1:16	-	37
88	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	37
89	ONT:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	35
91	O74:H42	<i>stx</i> <sub>1</sub>	+	-	+	1:16	-	16
92	O22:H8	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	NA	16
94	ONT:H-	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
95	O113:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	39
96	O163:H-	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	16
97	ONT:HNT	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2vhb</sub>	39
98	ONT:H21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	+	-	+	1:16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	39
100	O15:H27	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:8	NA	39
101	ONT:H16	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:2	<i>stx</i> <sub>2vO111/393</sub>	39
102	O174:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:4	NA	30
103	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	+	-	1:2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	30
104	O177:H-	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	+	-	1:16	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	39
105	ONT:H2	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	-	-	1:16	NA	16

NA – não houve amplificação com os iniciadores LIN F e LIN R para a análise por PCR-RFLP

ONT: antígeno “O” não tipável

HNT: antígeno “H” não tipável

R: Região geográfica do Estado do Paraná

NT: amostra não testada

\*: Título de STX no ensaio VTEC-Screen

## 6 DISCUSSÃO

A importância dos bovinos como fonte direta e indireta de contaminação dos humanos com STEC é inquestionável, embora diversas outras fontes de transmissão também estejam envolvidas.

Embora a presença de STEC possa ser minimizada através da implementação de elevados padrões de higiene, na prática não é possível erradicá-las do ambiente devido à colonização assintomática dos animais, da capacidade de sobreviver por longos períodos nas fezes bovinas, no pasto e na água (WANG *et al.* 1996; CAPRIOLI *et al.* 2005). Do ponto de vista bacteriológico devem ser adotados procedimentos diagnósticos que permitam discriminar os patógenos que representam alto risco à saúde da população para que sejam adotadas medidas preventivas e terapêuticas (TSCHÄPE e FRUTH, 2001).

Neste trabalho a ocorrência de STEC foi avaliada em bovinos de corte no Estado do Paraná, e foram determinadas as suas características antigênicas e de virulência.

Foi observada uma elevada frequência de STEC entre os bovinos, 57%. A ocorrência de STEC foi maior em bovinos das regiões do Norte Pioneiro e Centro-Sul do Estado (FIGURAS 1 e 2; TABELA 4). PIGATTO (2004), em estudo também realizado com bovinos de corte no Paraná relatou uma frequência de STEC de aproximadamente 40%, inferior à encontrada no presente trabalho. Esta discrepância pode ser devida ao período de coleta, uma vez que no trabalho de PIGATTO as amostras foram coletadas durante um período de 12 meses. Quando se considera apenas os meses quentes do ano a frequência de STEC foi similar à descrita nesse trabalho. A prevalência de STEC no gado depende da estação do ano, taxas mais elevadas são encontradas durante o verão (PATON e PATON, 1998a).

No Rio de Janeiro, CERQUEIRA *et al.* (1999) relataram 82% e 53% de positividade para STEC para o gado leiteiro e de corte, respectivamente. Em São Paulo, IRINO *et al.* (2005) encontraram uma frequência de 25% de STEC entre bovinos de leite. Estudo realizado com bezerros indicou 13% de positividade para STEC (LEOMIL *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul foi relatada frequência de 49% para STEC no gado leiteiro (MOREIRA *et al.*, 2003).

Embora poucos estudos tenham sido realizados no Brasil até o momento e o sorotipo O157:H7 já tenha sido descrito, aparentemente as STEC não-O157 são prevalentes em bovinos no país (CERQUEIRA *et al.*, 1999; LEOMIL *et al.* 2003; MOREIRA *et al.* 2003; IRINO *et al.* 2005). Os dados obtidos neste trabalho, realizado com bovinos do Paraná, reforçam essa possibilidade. Uma grande variedade de sorotipos de STEC tem sido implicada com doença em humanos, mas alguns sorotipos encontrados no gado nunca ou só raramente foram associados com infecção em humanos (<http://www.microbionet.com.au/vtec.htm>). No presente estudo, estirpes de STEC pertencendo a 31 diferentes sorotipos foram identificadas, e três novos sorotipos de STEC O152:H8; O175:H21 e O176:H18 foram descritos (TABELAS 5 e 8). A maioria (77,4%) dos sorotipos de STEC encontrados já foi isolada em humanos (<http://www.microbionet.com.au/vtec.htm>).

No Brasil, infecções causadas por STEC em humanos já foram relatadas (GUTH *et al.* 2002a, 2002b, 2003, 2005; IRINO *et al.* 2002; VAZ *et al.* 2004.). Casos esporádicos de diarreia estão associados com estirpes não-O157, em particular os sorotipos O111:H8 (H-), O26:H11 e O103:H2 (GUTH *et al.* 2003; VAZ *et al.* 2004.). Colite hemorrágica progredindo para complicações extra-intestinais como a SHU devido a O157:H7 ou outros sorotipos de STEC, são raramente descritos no Brasil, em contraste com a Argentina, país vizinho, que tem a maior incidência de SHU no mundo (LOPES *et al.* 1998).

As toxinas Shiga são o principal fator de virulência das STEC. A habilidade das STEC em provocar casos mais graves de doença como a SHU parece depender do tipo principal da toxina, Stx1 ou Stx2. Pessoas infectadas por estirpes produtoras de Stx2 desenvolvem SHU mais frequentemente do que aquelas infectadas por estirpes que produzem Stx1. Outros fatores de virulência também podem afetar o resultado clínico da infecção. A combinação *stx<sub>2</sub> eaeA* foi associada com sorotipos encontrados em humanos, particularmente com infecção mais severa. O gene *ehxA* também foi associado com estirpes de STEC mais virulentas (BEUTIN *et al.* 1998; BOERLIN *et al.* 1999; WELINDER-OLSSON *et al.* 2002).

Resultados obtidos neste trabalho indicam uma distribuição heterogênea dos genes associados com virulência nas estirpes de STEC (TABELA 6). Sete combinações distintas foram encontradas, sendo os genótipos *stx<sub>1</sub> stx<sub>2</sub> ehxA saa* (32,8%), *stx<sub>2</sub> ehxA saa* (26,6%) e *stx<sub>2</sub>* (21,9%) os mais freqüentes. Houve nítido



predomínio do gene *stx*<sub>2</sub> (97% no total; 55% isoladamente) entre as STEC, o que sugere que essas estirpes possam representar risco à saúde humana, uma vez que *stx*<sub>2</sub> é o fator de virulência mais importante associado com doenças severas (BOERLIN *et al.* 1999).

O gene *saa* foi detectado em 40 (62,5%) das estirpes, sempre associado com *ehxA*. Considerando que ambos são codificados em plasmídeos, e que apesar da heterogeneidade dos plasmídeos de STEC quanto à composição gênica (BRUNDER *et al.* 1999), a maioria das STEC contém apenas um plasmídeo de tamanho 90 kb (SOUZA, 2004), é provável que esses genes sejam carregados no mesmo plasmídeo. O gene *saa* tem sido encontrado apenas em estirpes que não contém *eaeA*, o que foi reforçado nesse trabalho. Embora *Saa* seja um fator de aderência, a sua contribuição para a patogenicidade das STEC ainda não foi elucidada.

Quatro estirpes (6,2%), pertencendo aos sorotipos O177:H<sup>-</sup> (2 estirpes), O157:H7, e ONT:H25, apresentaram o genótipo *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *eaeA*. Isto sugere que essas estirpes têm maior potencial de virulência, e que representam risco mais elevado para provocar complicações extra-intestinais.

A subtipagem dos genes *stx* é útil para propósitos epidemiológicos e para estimar o potencial de patogenicidade de um isolado. Foi sugerido que não somente o tipo principal de *Stx*, *Stx*<sub>1</sub> ou *Stx*<sub>2</sub>, mas também o tipo de variante da toxina pode ser importante para determinar a probabilidade de causar SHU (FRIEDRICH *et al.* 2002; EKLUND *et al.* 2002). Variantes descritas de *Stx*<sub>1</sub> diferem discretamente quanto à seqüência de nucleotídeos, com nenhuma consequência sobre as suas características antigênicas e toxicidade. A diversidade de variantes é maior para *Stx*<sub>2</sub>, em número e variabilidade nas características. Essas variantes diferem entre si em relação à seqüência de nucleotídeos, características antigênicas e toxicidade (MAINIL e DAUBE, 2005). Algumas variantes como *stx*<sub>2d</sub> e *stx*<sub>2e</sub> provavelmente são menos patogênicas para humanos, e a sua presença poderia prognosticar doença mais branda com um risco mínimo de SHU (FRIEDRICH *et al.* 2002). Entretanto a presença de *stx*<sub>2c</sub> e a associação *stx*<sub>2</sub> *stx*<sub>2c</sub> foram encontradas principalmente nos casos de colite hemorrágica e SHU (FRIEDRICH *et al.* 2002; EKHLUND *et al.* 2002). Uma dificuldade enfrentada é a falta de uniformidade na literatura para a classificação, de algumas variantes. Nomenclaturas diferentes têm sido utilizadas por diversos autores. Foi proposto que 5 variantes biológicas principais sejam

reconhecidas: Stx2 (representada pela estirpe EDL933), Stx2c (E32511 e B2F1), Stx2d, Stx2e (S1191 e 412) e Stx2f (H.I.8) (MAINIL e DAUBE, 2005).

As estirpes E32511 e B2F1 são diferentes em relação aos genes *stx* que contém. E32511 contém *stx*<sub>2</sub> e a variante *stx*<sub>2c</sub>, enquanto B2F1 contém os genes *stx*<sub>2vha</sub> e *stx*<sub>2vhb</sub> (citado em BASTIAN *et al.* 1998). Ambas foram isoladas de casos de SHU. As variantes *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>OX393</sub> e *stx*<sub>2vha</sub> apresentam o mesmo perfil de PCR-RFLP no sistema proposto por BASTIAN *et al.* (1998) e geralmente são referidas como “*stx*<sub>2c</sub>” (BASTIAN *et al.* 1998; EKLUND *et al.* 2002), enquanto *stx*<sub>2vhb</sub> apresenta perfil característico.

Entre as 62 STEC isoladas neste trabalho que continham genes *stx*<sub>2</sub>, como determinado por PCR-Multiplex, em 11 não foi possível determinar o subtipo de gene *stx*<sub>2</sub> presente, uma vez que não ocorreu amplificação no sistema de PCR para a reação de RFLP utilizada. Trinta e quatro estirpes (54,8%) apresentam o perfil de PCR-RFLP esperado para *stx*<sub>2-EDL933</sub>. Em 15 (24,2%) dessas o gene *stx*<sub>2</sub> foi encontrado isoladamente; em 14 (22,5%) em associação com *stx*<sub>1</sub> e em 5 (8,1%) estirpes em associação com variantes do tipo *stx*<sub>2</sub> (TABELAS 7 e 8 e FIGURAS 7, 8 e 9). Variantes do tipo *stx*<sub>2</sub> foram detectadas em 22 (35,5%) estirpes; isoladamente em 9 (14,5%), associados à *stx*<sub>1</sub> em 7 (11,3%), à *stx*<sub>2</sub> em 2 (3,2%), à *stx*<sub>1 stx</sub><sub>2</sub> em 3 (4,8%) e a outro variante em 1 (1,6%) estirpe (TABELA 7).

Em relação à frequência das variantes, genes *stx*<sub>2c</sub> foram encontrados em 12 (19,4%) estirpes, *stx*<sub>2vhb</sub> em 10 (16,1%) e *stx*<sub>2O111</sub> ou *stx*<sub>2OX392</sub> em uma (1,6%).

Entre as STEC portadoras de variantes de *stx*<sub>2</sub> algumas estirpes apresentam combinações que podem elevar o seu potencial de patogenicidade.

A STEC 86 contém a associação *stx*<sub>2c stx</sub><sub>2vhb</sub> e poderia ser em teoria similar a estirpe B2F1, responsável por caso de SHU.

As estirpes 43, 45, 103 e 104 contém os genes *ehxA* e *eaeA* (TABELA 8). Entre elas está uma estirpe do sorotipo ONT:H25. Estirpes desse sorotipo aparentemente são freqüentes nos bovinos e apresentam genótipo *stx*<sub>2vha eaeA ehxA</sub> (SHENG *et al.* 2005). A estirpe ONT:H25 isolada neste trabalho apresenta o genótipo *stx*<sub>2vhb.eaeA ehxA</sub>. O gene *stx*<sub>2vhb</sub> já foi relatado entre STEC não-O157 isoladas de bovinos no Brasil (GUTH, *et al.* 2003). Segundo EKLUND *et al.* (2002) em estudo utilizando apenas 5 estirpes portadoras do gene *stx*<sub>2vhb</sub> isoladamente, essas bactérias não foram encontradas associadas a casos de SHU, mas somente

com a colite hemorrágica e diarreia. Isto sugere que a estirpe que apresenta a combinação *stx<sub>2vhb</sub>.eaeA ehxA* difere em termos de virulência das demais.

Duas das estirpes de STEC isoladas neste trabalho apresentaram a variante *stx<sub>2c</sub>*, que já foi associada com SHU (FRIEDRICH *et al.* 2002; EKLUND *et al.* 2002), e uma das estirpes apresentou *stx<sub>2c</sub>* associada com *stx<sub>2</sub>* (FIGURA 8 e TABELAS 7 e 8). A associação *stx<sub>2</sub> stx<sub>2c</sub> eaeA ehxA* descrita por EKLUND *et al.* (2002) em estirpe de STEC sorotipo O157:H7 fagotipo 2, apresentou perfil particularmente virulento e foi mais frequentemente associada com SHU e colite hemorrágica que outras. Neste trabalho, o perfil *stx<sub>2</sub> stx<sub>2c</sub> eaeA ehxA* está associado com STEC sorotipo O177:H- , mas esta possibilidade não pode ser excluída.

Estudo realizado com estirpes do sorotipo O157:H7 isoladas no Brasil mostrou predomínio do subtipo *stx<sub>2vha</sub>*, (GUTH *et al.* 2003). No método de PCR-RFLP utilizado no presente trabalho, não é possível diferenciar entre *stx<sub>2c</sub>* e *stx<sub>2vha</sub>* (BASTIAN *et al.* 1998). Portanto a estirpe 103 (sorotipo O157:H7) e as estirpes 43 e 104 (sorotipo O177:H-) portadoras de “*stx<sub>2c</sub>*” devem ser caracterizadas através de outra metodologia para definir qual dos subtipos *stx<sub>2c</sub>*, *stx<sub>2OX393</sub>* ou *stx<sub>2vha</sub>* contém. Embora NISHIKAWA *et al.* (2000), tenham sugerido que variantes *stx<sub>2vha</sub>* provavelmente sejam menos virulentas, estirpes portadoras desse gene não são comuns entre indivíduos assintomáticos portadores de STEC (STEPHAN e HOELZLE, 2000). Também foi mostrado que estirpes que contém *stx<sub>2vha</sub>* isoladamente apresentam elevado nível de toxicidade em células Vero (BERTIN *et al.*, 2001), o que sugere que sejam virulentas.

A estirpe que contém um gene *stx<sub>2O111</sub>* ou *stx<sub>2OX392</sub>* – que apresentam o mesmo perfil no sistema de PCR-RFLP utilizado – considerada como grupo *stx<sub>2d</sub>* (PIÉRARD *et al.*, 1998) provavelmente representaria baixo risco para o desenvolvimento de infecções mais graves segundo FRIEDRICH *et al.* (2002) e EKLUND *et al.* (2002). Entretanto estirpes contendo genes *stx<sub>2O111</sub>* ou *stx<sub>2OX392</sub>* variam em termos de toxicidade. Enquanto o produto do primeiro gene apresenta baixa toxicidade oral para camundongos, o último apresenta toxicidade significativamente maior (PATON *et al.* 1995).

Considerando a necessidade de um diagnóstico rápido para a identificação de STEC, e o fato de que o ensaio de citotoxicidade em células Vero e testes com base na PCR não estão disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos, o desempenho

do imunoensaio VTEC-Screen, teste que pode ser utilizado na rotina de laboratórios, para a detecção de Stx foi avaliado. Segundo a literatura o VTEC-Screen é sensível para detectar os genes *stx*<sub>2</sub>, mas apresenta baixa sensibilidade para variantes como *stx*<sub>2e</sub>/*stx*<sub>2ev</sub> e *stx*<sub>2d-Ount</sub> (BEUTIN *et al.*, 2002 e STROCKBINE *et al.*, 1998). No presente trabalho, quando utilizado este ensaio, a presença de Stx não foi detectada em 2 das 35 estirpes que continham genes *stx*<sub>2</sub> detectados por PCR e no ensaio de citotoxicidade. Entre os 10 variantes que não estavam associados a *stx*<sub>1</sub> ou *stx*<sub>2</sub>, 8 não foram detectados; destes 6 continham *stx*<sub>2c</sub>, 2 *stx*<sub>2vhb</sub> e 1 *stx*<sub>2vo111/393</sub>. A ausência de reação com o produto de *stx*<sub>2vo111/393</sub> não surpreende, já que a baixa sensibilidade para genes do tipo *stx*<sub>2d</sub> já havia sido relatada (BEUTIN *et al.* 2002). A produção de Stx não foi detectada em 1 de 5 estirpes contendo *stx*<sub>2vhb</sub> e algumas estirpes contendo *stx*<sub>2c</sub> apresentaram títulos entre 1:4 a 1:16 no VTEC-Screen (EKLUND *et al.* 2002). Os resultados obtidos indicaram que o VTEC-Screen apresentou boa sensibilidade para a detecção de Stx<sub>2</sub>, mas não para os variantes detectados neste trabalho. Enquanto estudos de frequência de variantes para Stx<sub>2</sub> em indivíduos afetados por STEC na população brasileira não estiverem disponíveis, o uso do VTEC-Screen como teste de triagem, deve ser utilizado com cautela.

Em síntese, este trabalho demonstrou que o gado de corte do Estado do Paraná é um reservatório importante de STEC não-O157. As estirpes isoladas apresentaram grande diversidade em relação ao sorotipo e à composição gênica referente aos genes de virulência analisados e são potencialmente patogênicas para humanos.

Foram identificadas estirpes que apresentam diferentes riscos à saúde. Algumas delas provavelmente são capazes de causar apenas doença branda, enquanto outras apresentam maior potencial de virulência e risco mais elevado para provocar complicações graves como SHU.

Esses dados são relevantes para a saúde pública e é fundamental que sejam tomadas medidas preventivas para minimizar a disseminação dessas bactérias, especialmente considerando a inexistência de vacinas para STEC, o risco associado com o uso de antimicrobianos e as dificuldades para o isolamento desses microrganismos nos laboratórios de rotina.

## 7 CONCLUSÕES

**7.1** A frequência de STEC na amostra de bovinos analisada foi de 57%.

**7.2** Foram encontrados 31 sorotipos de STEC; 23 (35,9%) estirpes foram não tipáveis (ONT) e 9 antígenos H diferentes foram identificados. Os sorotipos mais freqüentes foram: ONT:H7; O22:H8; O82:H8 e O116:H21.

**7.3** Três sorotipos (O152:H8, O175:H21 e O176:H18) ainda não foram descritos na literatura associados com estirpes de STEC.

**7.4** O gene *stx*<sub>1</sub> foi encontrado em 2 (3,1%) das estirpes, *stx*<sub>2</sub> em 35 (54,7%); a presença simultânea dos dois genes foi detectada em 27 (42,2%) estirpes. O gene *ehxA* foi detectado em 46 (71,9%) estirpes, o gene *saa* em 40 (62,5%) e o gene *eaeA* em 4 estirpes (6,2%).

**7.5** Sete perfis genéticos diferentes foram encontrados considerando a presença ou não dos genes *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> *ehxA* *eaeA* e *saa*. O perfil genético *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA* e *saa* foi o mais freqüente (32,8%). A associação *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* foi encontrada em apenas 4 estirpes pertencendo aos sorotipos, ONT:H25, O177:H-e O157:H7.

**7.6** A presença de genes do tipo *stx*<sub>2</sub> foi encontrada em 62 estirpes. Destas 15 (24,2%) continuam o gene *stx*<sub>2EDL933</sub> isoladamente; 14 *stx*<sub>2</sub> (22,5%) associado com *stx*<sub>1</sub>; e 5 (8,1%) associados com variantes. A presença de variantes de *stx*<sub>2</sub> foi detectada em 22 estirpes. A metodologia empregada não permitiu subtipar os genes tipo *stx*<sub>2</sub> presentes em 11 estirpes. Os seguintes variantes foram identificados:

- *stx*<sub>2c</sub> em 12 (23,5%) estirpes; isoladamente em 7 estirpes; associado com *stx*<sub>1</sub> em 3 estirpes e com *stx*<sub>2</sub> em 1 estirpe.
- *stx*<sub>2v**hb**</sub> em 10 (19,6%) estirpes; isoladamente em 1 estirpe; associado com *stx*<sub>1</sub> em 4 estirpes; com *stx*<sub>2c</sub> em 1 estirpe e com *stx*<sub>1</sub> *stx*<sub>2</sub> em 3 estirpes.
- *stx*<sub>2O111/OX392</sub> em 1 (2%) estirpe.

**7.7** O imunoensaio VTEC-SCREEN apresentou 22,6% de resultados falsos negativos.

## REFERÊNCIAS

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A.G.; TRABULSI, L.R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of Intimins  $\alpha, \beta, \gamma$ , and  $\delta$ , four Intimin derivatives expressed by Attaching and Effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 662-668, 1998.

ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS JUNIOR, 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.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley&Sons, 1999.

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

BATCHELOR, M.; KNUTTON, S.; CAPRIOLI, A.; HUTER, V.; ZANIAL, M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Development of a universal Intimin antiserum and PCR primers. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, p. 3822-3827, 1999.

BERKELMAN, R.L. Introduction-demographic and social changes have contributed to the emergence of infectious diseases. In: HORSBURG Jr. R.C.; NELSON, A.M. **Pathology of Emerging Infections**. Washington, D.C.: ASM, 1997, p. 1-19.

BERTIN, Y.; BOUKHORS, K.; PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; MARTIN, C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3060-3065, 2001.

BERTIN, Y.; BOUKHORS, K.; LIVRELLI, V.; MARTIN, C. Localization of the insertion site and pathotype determination of the Locus of Enterocyte Effacement of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 61-68, 2004.

BETTELHEIM, K.A.; BEUTIN, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 205-217, 2003.

BETTELHEIM, K. A. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: a red herring? **J. Med. Microbiol.** v. 50, p. 201-202, 2001.

BEUTIN, L.; ALEKSIC, S.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Med. Microbiol. Immun.**, v. 34, p. 13-21, 1994.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMAN, S.; STEPHAN, R. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2559-2564, 1989.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy animals. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p.2483-2488, 1993.

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n.4, p. 635-639, 1998.

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Evaluation of the VTEC-screen "Seiken" test for the detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 42, p. 1-8, 2002.

BIELASZENSKA, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. **W. J. Microbiol&Biotech.**, v. 16, p. 711-718, 2000.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M.P.; DAHBI, G.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and Intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, p. 1351-1356, 2003.

BOERLIN, P.; McEWEN, S.A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R.P.; GYLES, C.L. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in human. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n.3, p. 497-503, 1999.

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

BURK, C.; DIETRICH, R.; AÇAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M.; MÄRTLBAUER, E.M. Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of Bovine Origin. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 5, p. 2106-2112, 2003.

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



CALDERWOOD, S.B.; AUCLAIR, F.; DONAHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.T.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 4364-4368, 1987.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A.E. Epidemiology of Shiga toxin –producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. In: KARPER, 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.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res. INRA**, EDP Science, v. 36, p. 289-311, 2005.

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. Tese (Doutor em Ciências). Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

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

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 3462-3465, 1996.

CLEARY, T.G. The Role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.** v. 15, p. 260-265, 2004.

COBBOLD, R. N.; RICE, D. H.; SZYMANSKY, M.; CALL, D. R.; HANCOCK, D. D. Comparison of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 4375-4378, 2004.

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

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

DE BAETS, L.; VAN DER TAELEN, I.; DE FILETTE, M.; PIÉRARD, D.; ALLISON, L.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J. P.; IMBERECHTS, H. Genetic typing of Shiga toxin 2 variants of *Escherichia coli* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Appl Environ. Microbiol.** v.70, p. 6309-6314, 2004.

DE BOER, E.; HEUVELINK, A. E. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.** Symp. Supl., v. 88, p. 133S-143S, 2000.

DE TONI, F. ***Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) em Crianças no Estado do Paraná**. Curitiba, 2003. 87f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Área de Concentração Análises Clínicas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

DIEZ-GONZALEZ, F.; CALLAWAY, T.R.; KIZOOLIS, M.G.; RUSSEL, J.B. Grain feeding and the dissemination of acid-resistance *Escherichia coli* from cattle. **Science**. v. 281, n. 5383, p. 1666-1668, 1998.

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

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

EKLUND, M.; SCHEUTZ, F.; SIITONEN, A. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. **J. Clin. Microbiol.** v.39, n.8, p. 2829-2834, 2001.

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, p. 2999-3003.

EWING, W. H. **Edwards&Ewing's Identification of Enterobacteriaceae** 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1986.

FAN, E.; MERRITT, E. A.; VERLINDE, C. M. J.; HOL, W. G. J. AB<sub>5</sub> toxins: structures and inhibitor design. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, p. 680-686, 2000.

FASANO, A. Cellular Microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal host. **ASM News**, v. 63, n.5, p. 259-265, 1997.

FENG, P. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerg. Infect. Dis.**, v.1, n. 2, p. 47-52, 1995.

FEY, P.D.; WICKERT, R.S.; RUPP, M.E.; SAFRANEK, T.I.; HINRICHS, S.H. Prevalence of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 6, p. 530-533, 2000.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 911-921, 1998.

FRIEDRICH, A.W.; BIELASZEWSKA, M.; KARCH, H. Diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **J. Lab. Med.**, v 26, p. 183-190, 2002.

FUKUSHIMA, H.; GOMYODA, M. Na Effective, rapid and simple method for isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces and food samples. **Zent.bl. Bakteriol.** v. 289, p. 415-428, 1999.

GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E.J.G. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p. 1268-1274, 1993.

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 535-536, 2002a.

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**, v. 97, p. 1085-1089, 2002b.

GUTH, B.E.C.; CHINEN I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.F.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.C.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p. 335-349, 2003a.

GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Inability to decarboxylate lysine as a presumptive marker to identify Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O111. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, p. 3450, 2003b.

GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; GOMES, T.A.T.; CHINARELLI, S.H.; ROCHA, M.M.M.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; IRINO, K. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 805-806, 2005.

GYLES, C.; JOHNSON, R.; GAO, A.; ZIEBELL, K.; PIERARD, D.; ALEKSIC, S.; BOERLIN, P. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, p. 4134-4141, 1998.

GYLES, C.; JOHNSON, R.; GAO, A.; ZIEBELL, K.; PIERARD, D.; ALEKSIC, S.; BOERLIN, P. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4134-4141, 1998.

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.

HORNITZKY, M. A.; VANSELOW, B. A.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K. A.; CORNEY, B.; GILL, P.; BAYLEY, G.; DJODJEVIC, P. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, 6439-6445, 2002.

HEUVELINK, A.E.; VAN DEN BIGGELAAR, F.L.A.N.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M.; HERBES, R.G.; HUYBEN, R.; NAGELKERKE, N.; MELCHERS, W.J.G.; MONNENS, L.A.H.; BOER, E. Occurrence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **J. Clin. Microbiol.** v 36, p. 3480-3487, 1998.

IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; VAZ, T.M.I.; KANO, E.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GONÇALVES, C.R.; GUTH, B.E.C.; P226-Prevalence of Shiga toxin and intimin gene Sequences among *Escherichia coli* of serogroups O26, O55, O111, O 119 and O157 Isolated in Sao Paulo, Brazil. 4<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON "SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS", Kyoto, Japan. **Program & Abstracts**, p. 107, 2000.

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. O157: H7 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 4, p. 446-447, 2002.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.; GUTH, B.E.C.. P239-Serotypes and virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, Sao Paulo, Brazil. 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON "SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)– PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, Edinburgh – Scotland. **Final Programme and Book of Abstracts**, Edinburgh : Venue EICC, p. 33, 2003.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F., VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.** v. 105, p. 29-36, 2005.

JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R.K.; NEWLAND, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol.Lett.**, v.44, p. 109-114, 1987.

JENKINS, C.; PEARCE, M.C.; SMITH, A.W.; KNIGHT, H.I.; SHAW, D.J.; CHEASTY, T.; FOSTER, G.; GUNN, G.J.; DOUGAN, G.; SMITH, H.R.; FRANKEL, G. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 207-212, 2003.

JOHNSON, R.P.; CLARKE, R.C.; WILSON, J.B.; READ, S.C.; RAHN, K.; RENWICK, S.A.; SANDHU, K.A.; ALVES, D.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; McEWEN, S.A.; SPIKA, J.S.; GYLES, C.L. Growing Concerns and Recent Outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of Verotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Food Protection.**, v. 59, p. 1112-1122, 1996.

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

KAPLAN, B.S.; MEYERS, K.E.; SCHULMAN, S.L. The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome. **J. Am. Soc. Nephrol.** p. 1126-1133, 1998.

KARCH, H.; BÖHM, H.; SCHIMIDT, H.; GUNZER, F.; ALEKSIC, S. & HEESEMANN, J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, Sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1200-1205, 1993.

KARCH, H.; MITTMANN, C.J.; ALEKSIC, S.; DATZ, M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, p. 516-519, 1996.

KARCH, H.; BIELASZENSKA, M.; SCHIMIDT, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 229-243, 1999.

KARCH, H.; SCHMIDT, H.; BRUNDER, W. Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7. 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. 183-194.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 775-782, 1985.

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. **J. Clin. Microbiol.** v. 22, p. 614-619, 1995.

KARMALI, M. A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, K.; KAPER, J.B. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, p. 4930-4940, 2003.

KARMALI, M.A. Use of comparative genomics as a tool to assess the clinical and public health significance of emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes. **Meat Science.** (article in press), 2005.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WIN JR., W.C. **Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, 1997.

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

LAW, D. The history and evolution of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **W. J. Microbiol&Biotech.**, v. 16, p. 701-709, 2000.

LAEGREID, W.W.; ELDER, R.O.; KEEN, J.E. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in range beef calves at weaning. **Epidemiol. Infect.**, v. 123, p. 291-298.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.C.; IRINO, K.; VETORRATO, 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 Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 97, p. 103-109, 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.

LIRA, W. M.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **J. Appl. Microbiol.** v. 97, p. 861-866, 2004.

LOPES, E.L.; CONTRINI, M.M.; DE ROSA, M.F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 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.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of Enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **J. Appl. Microbiol.** v. 98, p. 1332-1344.

MAKINO, S.; TOBE, T.; ASAKURA, H.; WATARAI, M.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; SASAKAWA, C. Distribution of the secondary Type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**v. 41, p. 2341-2347, 2003.

MARCH, S.B.&RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, p. 869-872, 1986.

MERCADO, E.C.; GIOFFRÉ, A.; RODRÍGUEZ, S.M.; CATALDI, A.; IRINO, K.; ELIZONDO, A.M.; CIPOLLA, A.L.; ROMANO, M.I.; MALENA, R.; MÉNDEZ, M.A. Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. **J. Vet. Med.** v. 51, p. 82-88, 2004.

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

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; NAKAYAMA, T.; EJIMA, Y.; HIROE, K.; TANAKA, H.; FUGITA, 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.

MILLER, M.P. **RxC**: A program for the analysis of contingency tables. 1997. Disponível em: [http://www.marksgeneticsoftware.net/vti\\_bin/shtml.exe/rxc.htm](http://www.marksgeneticsoftware.net/vti_bin/shtml.exe/rxc.htm). Acesso em : 01 nov 2005.

MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; THOMSON-CARTER, F.; USERA, M. A.; BARTOLOMÉ, R.; PRATS, G.; BLANCO, J. Phage Types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 4007-4015. 2004.

MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.** v.93, p. 179-183, 2003.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.88, n. 1, p. 142-201, 1998.

NAKAO, H.; KIMURA, K.; MURAKAMI, H.; MARUYAMA, T.; TAKEDA, T. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan **Fems Immun. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 289-297, 2002.

NIELSEN, E.M.; TEGTMEIER, C.; ANDERSEN, H. J.; GRONBAEK, C.; ANDERSEN, J.S. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 245-257, 2002.

NISHIKAWA, Y.; ZHOU, Z.; HASE, A.; OGASAWARA, J.; CHEASTY, T.; HARUKI, K.; Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka city, Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2440-2442, 2000.

O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W.; FORMAL, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**, v. 2, p. 702, 1983.

O'LOUGHLIN, E.V.; ROBINS-BROWNE, R.M.; Effect of Shiga toxin and Shiga-like Toxin on eukaryotic cells. **Microbes and Infection**. V. 3, p. 493-507, 2001.

OLSVIC, O.; STROKBINE, 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, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. **J. Higiene**, Cambridge, v. 95, p. 551-575, 1985.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHÈS, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.** v. 68, p. 64-71, 2000.

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. **Vet. Microbiol.** (article in press) 2003.

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

PATON, A. W.; BOURNE, A. J.; MANNING, P.A.; PATON, J.C. Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2450-2458, 1995.

PATON, A. W.; RATCLIFF, R. M.; DOYLE, R.M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANSER, J.A.; PATON, J. C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1622-1627, 1996.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Instability of a Shiga toxin type 2 gene in *Enterobacter cloacae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n.7, p. 1917, 1997.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, p. 450-479, 1998a.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*,



enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 598-602, 1998b.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by Locus of Enterocyte Effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6999-7009, 2001.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *ehxA* and *saa*. **J. Clin. Microbiol.**, v 40, p. 271-274, 2002.

PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, L.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of new Verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 3317-3322, 1998.

PIGATTO, C P. **Isolamento e frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no Estado do Paraná.** Curitiba, 2003. 85f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Área de concentração Patologia, Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

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 the Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.** V. 28, p. 540-545, 1990.

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

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

RAY, P.E.; LIU, X.H. Pathogenesis of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. **Pediatr. Nephrol.** v. 16, p. 823-839, 2001.

RICHARDS, M.S.; CORKISH, J.D.; SAYERS, A.R.; McLAREN, I.M.; EVANS, S.J.; WRAY, C. Studies of the presence of verocytotoxic *Escherichia coli* O157 in bovine faeces submitted for diagnostic purposes in England and Wales and on beef carcasses in abattoirs in the United Kingdom. **Epidemiol. Infect.**, v 120, p. 187-192, 1998.

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. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

RITCHIE, J. M.; WAGNER, P. L.; ACHESON, D. W. K.; WALDOR, M. K. Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-

associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 1059-1066, 2003.

ROBINS-BROWNE, R.M.; ELLIOT, 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.

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

SANGER, F.; NICKLED, S.; COULSON, A. R. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect. Immun.** V. 63, p. 1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 17, p. 14-56, 2004.

SHENG, H.; DAVIS, M. A.; KNECHT, H. J.; HANCOCK, D. D.; DONKERSGOED, J. V.; HOVDE, C. J. Characterization of a Shiga toxin-, intimin-, and enterotoxin hemolysin-producing *Escherichia coli* ONT:H25 strain commonly isolated from healthy cattle. **J. Clin. Microbiol.**;v. 43, p. 3213-3220, 2005.

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.

SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 10, p. 2364-2367, 1996.

SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P.I.; FROSCH, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence of clonality. **J. Infect. Dis.**, 179, p.115-123, 1999.

SHIMA, K.; TERAJIMA, J.; SATO, T.; NISHIMURA, K.; TAMURA, K.; WATANABE, H.; TAKEDA, Y.; YAMASAKI, S. Development of a PCR-Restriction Length Polymorphism assay for the epidemiological analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 5205-5213, 2004.

SOUZA, M.; R.; S.; M. **Caracterização Bioquímica, Suscetibilidade a Antimicrobianos e Perfil Plasmidial de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica**. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Área de Concentração Análises Clínicas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

SPIKA, J.S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P.; MILLEY, D.; WILSON, J.; WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canada. 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.

SPINA, N.; ZANSKY, S.; DUMAS, N.; KONDRAKI, S. Four laboratory-associated cases of infection with *Escherichia coli* O157:H7. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, p. 2938-2939, 2005.

SRIMANOTE, P.; PATON, A. W.; PATON, J. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.** v. 70, p. 3094-3100, 2002.

STAATS, J.; CHENGAPPA, M.M.; DEBEY, M.C.; FICKBOHM, B.; OBERST, R. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (*estA* and *elt*) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. **Vet. Microbiol.** v. 94, p. 303-312, 2003.

STATSOFT. Microsoft, Inc. Statistica for Windows. Tulsa, 1998. v. 5.51CD-ROM

STEPHAN, R.; HOELZLE, L.E. Characterization of Shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic humans carriers by PCR-RFLP. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 31, p. 139-142, 2000.

STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.M.; NEWLAND, J.M.; SMITH, H.W.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infect. Immun.**, v. 170, p. 1116-1122, 1986.

STROCKBINE, N. A.; JACKSON, M. P.; SUNG, L. M.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* Type I. **Infect. Immun.**, v. 170, p. 1116-1122, 1998.

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

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

TOMA, C.; ESPINOSA, E. M.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 4937-4946, 2004.

TORRES, A. G.; GIRON, J. A; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F. R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J. B. Identification and characterization of

*lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.** v. 70, p. 5416-5427, 2002.

TORRES, A.; KAPER, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. **Infect. Immun.** v. 71, p. 4985-4995, 2003.

TSCHÄPE, H.; FRUTH, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: MÜLDORFER, I.; SCHÄFER, K.P. Emerging bacterial pathogens. v. 8. In: SCHMIDT, A. (Ed.) **Contributions to Microbiology**. Basel: Karger, 2001. p. 1-11.

TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VANDERCHOVE, D.; HOOF, J.V.; ZUTTER, L.D. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. **Vet. Microbiol.**, v. 94, p. 341-346, 2003.

TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; WANG, G.; ROZEE, K.R. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, p. 1339-1343, 1991.

VARMA, J.K.; GREENE, K.D.; RELLER, M.E.; DE LONG, S.M.; TROTTIER, J.; NOVICKI, S.F.; DI ORIO, M.; KOCH, E.M.; BANNERMAN, T.M.; YORK, S.T.; LAMBERT-FAIR, M.; WELLS, J.G.; MEAD, P.S. AN Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. **JAMA.** v. 290, p. 2709-2712, 2003.

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C.; ROCHA, M.M.M.; GUTH, B.E.C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p. 903-905, 2004.

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

WANG, G.; CLARK, C. G.; RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 3613-3619, 2002.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 2567-2570, 1996.

WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 2936-2943, 2003.

WELINDER-OLSSON, C.; BADENFORS, M.; CHEASTY, T.; KJELLIN, E.; KAIJSER, B. Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 959-964, 2002.

WELLS, J.G.; SHIPMAN, L.D.; GREENE, K.D.; SOWERS, E.G.; GREEN, J.H.; CAMERON, D.N.; DOWNES, F.P.; MARTIN, M.L.; GRIFFIN, P.M.; OSTROFF, S.M.; POTTER, M.E.; TAUXE, R.V.; WACHSMUTH, K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 985-989, 1991.

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M. H.; AMMON, A.; TSCHÄPE, H. Strong association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx*<sub>2</sub> and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 22, p. 726-730, 2003.

WILSON, J.B.; McEWEN, S.A.; CLARKE, R.C.; LESLIE, K.E.; WILSON, R.A.; WALTNER-TOEWS, D.; GYLES, C.L. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. **Epidemiol. Infect.**, v. 108, p. 423-439, 1992.

WHO. **Prevention and Control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections.** Geneva, 1997. (Report of a WHO Consultation, 28 april-1 may, 1997).

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

WONG, C. S.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WATKINS, S. L.; TARR, P. I. The risk of the Hemolytic-Uremic Syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. **N. Engl. J. Med.** v. 342, n.26, p. 1930-1936, 2000.

ZWEIFEL, C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; STEPHAN, R. Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. **I. J. Food Microbiol.** v. 95, p. 19-27, 2004.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx*<sub>1c</sub>) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 1441-1446, 2002.

ZHANG, X.; McDANIEL, A.D.; WOLF, L.E.; KEUSCH, G.T.; WALDOR, M.K.; ACHESON, D.W.K. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages toxin production and death mice. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 664-670, 2000.