

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

**Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga  
(STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas  
carcaças dos animais abatidos**

**Ana Eucares von Laer**

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo

2008

19490

DEDALUS - Acervo - CQ.



30100015122

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Von Laer, Ana Eucares

V947c Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas carcaças dos animais abatidos / Ana Eucares Von Laer. -- São Paulo, 2008.

135p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Microbiologia de alimentos 2. Bromatologia 3. Alimento : Segurança : Saúde pública I. T. II. Destro, Maria Teresa, orientador.

664.07 CDD

**Ana Eucares von Laer**

**Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga  
(STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas  
carcaças dos animais abatidos**

Comissão Julgadora da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Prof. Dra. Maria Teresa Destro  
orientadora/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, 10 de 08 de 2009

Ao tio Colmar, que sempre esteve e sempre estará comigo.

## **Agradecimentos**

À Prof. Dra. Maria Teresa Destro pela confiança, incentivo, paciência, amizade e principalmente pelos ensinamentos.

À Prof. Dra. Mariza Landgraf pelas sugestões, confiança e amizade.

À Prof. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pela amizade e convívio.

À Dra. Karla Taddei e Prof. Dra. Marina Baquerizo pela ajuda inestimável, orientação e ensinamentos na execução do teste em células Vero.

À Dra. Kinue Irino e à Dra. Tânia Maria Ibele Vaz do Instituto Adolfo Lutz pela imensa contribuição na sorotipificação e disponibilização de cepas padrão.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza e Dra. Marcia Regina Franzolin do Instituto Butantan pela disponibilização de cepas padrão.

Ao Dr. Helge Karch pela disponibilização de cepas padrão.

Aos meus avós que sempre acreditaram em mim, me incentivaram e suportaram a saudade.

À minha mãe que faz de tudo para que eu realize meus sonhos e seja feliz, que sofreu calada cada telefonema aos choros e nunca deixou de me apoiar.

Ao meu pai que, sempre que possível, me ajudou e esteve ao meu lado.

À “tia-mãe” Maria, por todo o amor e alegria ao me ver em casa, por toda ajuda e incentivo.

Aos meus irmãos que sempre fizeram o possível para me ajudar, em especial à minha irmã Paulina pelo apoio e carinho em todos os momentos.

Ao Pedro, meu “sobrinho-filho”, pela alegria que nos trouxe e a contagem regressiva a cada retorno.

Aos verdadeiros e grandes amigos que São Paulo me deu e que levarei comigo, Anja, Cê, Katinha, Tati, Vanessa, André, Vinícius, Gabi e Lina por todo

carinho, incentivo, apoio, ajuda, amizade e até mesmo abrigo. Sem vocês teria sido muito difícil.

Às amigas de Pelotas, Baixa, Érica, Carô, Cris, Kika e Martha pela amizade, carinho e incentivo sempre.

À minha irmã de coração, Adri, por toda a força, carinho, conselhos e imensa amizade.

Ao Gabriel, pelo incentivo, amizade e confiança.

À Samara e Núbia pela amizade, convívio, ajuda e alegria.

Aos amigos que passaram e que continuam no laboratório, Anderson, Crystina, Danielle, Eb, Graciela, Hans, Janaína, Kátia Lima, Keila, Lúcia, Marildes, Mônica, Matheus, Paulo, Priscila e Verônica pela amizade, colaboração e ensinamentos.

Ao Wladimir por nunca ter deixado de acreditar em mim, pela amizade e conselhos.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Mônica, Cleonice e Edilson da secretaria do departamento, pelos serviços prestados.

À Elaine e Jorge da secretaria de Pós-Graduação, pela atenção dedicada e serviços prestados.

Muito obrigada!!!

## ÍNDICE

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Anexos	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
1. Introdução	1
Familia Enterobacteriaceae	1
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	2
Grupos enteropatogênicos	4
<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC)	6
Fatores de patogenicidade de STEC	9
Toxina de Shiga	10
Ilha de patogenicidade LEE ( <i>Locus of Enterocyte Effacement</i> )	14
Entero-hemolisina	17
Infecções por STEC	18
Contaminação dos alimentos	22
Ferramentas utilizadas na identificação e caracterização de STEC	26
Criação intensiva de bovinos (Embrapa, 2008)	29
2. Objetivos	31
Gerais	31
Específicos	31
3. Material e métodos	32
3.1 Material	32

3.1.1 Isolados de <i>E. coli</i>	32
3.1.2 Cepas padrão	33
3.2 Métodos	34
3.2.1 Avaliação da atividade hemolítica	34
3.2.2 Avaliação da presença de genes <i>eaeA</i> , <i>stx<sub>1</sub></i> , <i>stx<sub>2</sub></i> , <i>uidA</i> e <i>ehxA</i>	35
Preparo do DNA	35
Reação em cadeia da polimerase	35
Visualização dos produtos da PCR	36
3.2.3 Avaliação da presença dos genes codificadores das variantes de toxina de Shiga	39
Preparo do DNA	39
Reação em cadeia da polimerase	39
Restrição do produto da PCR para o gene <i>stx<sub>2</sub>B/stx<sub>2c</sub>B</i> para diferenciar entre as variantes Stx2 e Stx2c	41
Visualização dos produtos da PCR	41
3.2.4 Sorotipificação	42
3.2.5 Avaliação da presença dos genes codificadores das variantes de intimina	42
Preparo do DNA	42
Reação em cadeia da polimerase	43
Visualização dos produtos da PCR	45
3.2.6 Avaliação da atividade citotóxica	45
3.2.6.1 Citotoxicidade em células Vero (Konowalchuk <i>et al.</i> , 1977)	45
Preparo do sobrenadante das culturas de <i>E. coli</i>	45
Testes em células Vero	46
3.2.6.2 Citotoxicidade em células Vero (Karmali <i>et al.</i> , 1985)	46
Preparo do sobrenadante das culturas de <i>E. coli</i> sem sulfato de polimixina B	46
Preparo do sobrenadante das culturas de <i>E. coli</i> com sulfato de polimixina B	47

Teste em células Vero	47
3.2.7 Avaliação da produção de toxina da Shiga por ensaio imunocromatográfico	48
3.2.8 Avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR para detecção de genes para Stx e do teste imunocromatográfico (Duopath®)	48
3.2.9 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	49
Suspensão celular	49
Preparo dos blocos de agarose	49
Lise celular e lavagens	50
Restrição	50
Eletroforese	50
Análises dos resultados	51
4. Resultados e Discussão	52
4.1 Avaliação da atividade hemolítica	52
4.2 Avaliação da presença de genes <i>eaeA</i> , <i>stx<sub>1</sub></i> , <i>stx<sub>2</sub></i> , <i>uidA</i> e <i>ehxA</i>	53
4.3 Avaliação da presença dos genes das variantes de toxina de Shiga	55
4.4 Sorotipificação	69
4.5 Avaliação da presença dos genes das variantes de intimina	76
4.6 Avaliação da atividade citotóxica	79
4.6.1 Citotoxicidade em células Vero	79
4.6.2 Avaliação da produção de toxina da Shiga por ensaio imunocromatográfico	83
4.7 Avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR para detecção de genes para Stx e do teste imunocromatográfico (Duopath®)	86
4.8 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	87
5. Conclusões	106
6. Referências Bibliográficas	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Cepas padrão utilizadas como controle positivo e negativo nos ensaios deste estudo, suas características de interesse e procedência.	34
Tabela 02 – <i>Primers</i> utilizados para a detecção dos genes <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> e <i>uidA</i> por PCR segundo Feng e Monday (2000).	36
Tabela 03 – Cepas de <i>E. coli</i> não fermentadoras de sorbitol pré-selecionadas para as avaliações seguintes, através dos resultados obtidos na pesquisa da atividade hemolítica e presença dos genes <i>eaeA</i> , <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>uidA</i> e <i>ehxA</i> .	37
Tabela 04 – Cepas de <i>E. coli</i> fermentadoras de sorbitol pré-selecionadas para as avaliações seguintes, através dos resultados obtidos na pesquisa da atividade hemolítica e presença dos genes <i>eaeA</i> , <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>uidA</i> e <i>ehxA</i> .	38
Tabela 05 – Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes das variantes de Stx por PCR.	40
Tabela 06 – Condições empregadas nos ciclos de amplificação da PCR para a avaliação da presença dos genes das variantes de Stx.	40
Tabela 07 – Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes das variantes de intimina, <i>eae-α</i> , <i>eae-γ</i> , <i>eae-β</i> , <i>eae-ε</i> , <i>eae-ζ</i> , <i>eae-ι</i> , <i>eae-η</i> , <i>eae-κ</i> e <i>eae-θ</i> por PCR.	44
Tabela 08 – Condições empregadas nos ciclos de amplificação da PCR para a avaliação da presença dos genes das variantes de intimina.	44

Tabela 09 – Presença dos genes <i>eaeA</i> , <i>stx<sub>1</sub></i> , <i>stx<sub>2</sub></i> , <i>uidA</i> e <i>ehxA</i> , produção de entero-hemolisina e origem das cepas de <i>E. coli</i> .	53
Tabela 10 – Variantes dos genes <i>stx<sub>1</sub></i> e <i>stx<sub>2</sub></i> identificadas em cepas de <i>E. coli</i> .	56
Tabela 11 – Características das cepas identificadas como STEC.	60
Tabela 12 – Características das cepas identificadas como EPEC atípicas.	62
Tabela 13 – Sorotipos/ sorogrupos e origem das 50 cepas de <i>E. coli</i> caracterizadas como STEC.	70
Tabela 14 – Sorotipos/ sorogrupos e origem das 12 cepas de <i>E. coli</i> caracterizadas como EPEC atípicas.	71
Tabela 15 – Distribuição dos genes <i>stx<sub>1</sub></i> e/ou <i>stx<sub>2</sub></i> nas cepas que apresentaram citotoxicidade em células Vero.	80
Tabela 16 – Relação entre a capacidade de produção de Stx, avaliada por ensaio imunocromatográfico (Duopath Verotoxin®) e presença dos genes <i>stx<sub>1</sub></i> e <i>stx<sub>2</sub></i> por cepas STEC.	83
Tabela 17 – Avaliação da citotoxicidade em células Vero, presença dos genes codificadores de Stx e detecção e identificação de Stx por teste imunocromatográfico por 50 cepas de <i>E. coli</i> STEC.	85
Tabela 18 – Relação entre os perfis genéticos obtidos com a análise por PFGE e os sorotipos das cepas e a origem das mesmas.	88
Tabela 19 – Relação entre os perfis PFGE, origem das cepas, data de coleta das amostras e sorotipos/sorogrupos das 50 cepas STEC.	89
Tabela 20 – Cepas de <i>E. coli</i> sorbitol negativo avaliadas neste experimento.	99
Tabela 21 – Cepas de <i>E. coli</i> fermentadoras de sorbitol avaliadas neste experimento.	101

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Esquema demonstrando o tipo de lesão A/E causada por cepas de STEC. Fonte: Nataro e Kaper (1998). 15
- Figura 02 – Detecção dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* e *uidA*, por PCR segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação. 54
- Figura 03 – Detecção do gene *ehxA*, por PCR segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: *E. coli* O157:H7; C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação. 54
- Figura 04 – Detecção dos genes *stx<sub>1c</sub>* (A), *stx<sub>2c</sub>* (B) e *stx<sub>2d</sub>* (C), por PCR segundo Zhang *et al.* (2002a), Friedrich *et al.* (2002) e Piérard *et al.* (1998), respectivamente. M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: cepa controle positivo (Tabela 01); C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação. 57
- Figura 05 – Detecção dos genes *stx<sub>2datv</sub>* (A), *stx<sub>2e</sub>* (B) e *stx<sub>2f</sub>* (C), por PCR segundo Jelacic *et al.* (2003), Franke *et al.* (1995) e Schmidt *et al.*, 2000, respectivamente. M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: cepa controle positivo (Tabela 01); C-: *E. coli* K12. 57

Figura 06 – Detecção dos genes *eaεβ* (A) e *eaεγ* (B), por PCR segundo Oswald *et al.* (2000) e Schmidt *et al.* (1993), respectivamente. M: marcador de peso molecular (1 kb); C+: cepa controle positivo (Tabela 01); C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

77

Figura 07 – Representação da relação genética entre os 29 perfis PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) obtidos com a enzima de restrição XbaI a partir de 66 cepas de *E. coli*. Consulte a Tabela 18 para identificação da origem das cepas.

95

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Composição do caldo CAYE (Merck, Alemanha)	132
Anexo B – Composição do caldo Penassay	133
Anexo C – Composição do PBS (salina tampão fosfato)	134
Anexo D – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	135

## Resumo

*Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) são consideradas importantes patógenos de origem alimentar que apresentam o trato intestinal de ruminantes domésticos, principalmente bovinos, seu reservatório natural. Esses microrganismos estão associados a doenças severas em humanos, tais como colite hemorrágica (CH) e síndrome urêmica hemolítica (SHU). Este trabalho teve como objetivos avaliar a ocorrência de STEC em diferentes fontes, ambientais ou não, da criação e abate de bovinos confinados. Além disso, detectar a presença dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA* e *eaeA*; identificar cepas O157:H7 através da pesquisa do gene *uidA*; evidenciar a capacidade de produção de Stx e de Eh; identificar variantes de *stx* e de *eaeA*; e determinar os sorotipos e a diversidade genética das cepas de STEC. A avaliação da presença dos genes (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* e *uidA*) e da produção de Eh foi utilizada como triagem para a seleção de cepas possivelmente patogênicas, sendo que do total de 628 isolados avaliados, foram selecionadas 50 cepas STEC e 12 consideradas como EPEC atípicas. Das STEC, 76% foram isolados provenientes de amostras de fezes, enquanto 18% foram de amostras de carcaças e 6% de amostras de água da baía. Seis cepas isoladas de fezes e 1 de carcaça foram sorotipificadas como O157:H7, todas positivas para a presença do gene *uidA*. Além do sorogrupo O157, nenhum outro, dentre os principais causadores de surtos e casos esporádicos de CH e SHU, foi detectado. Das 30 cepas que apresentaram resultado positivo no ensaio de citotoxicidade em células Vero, 96,7% apresentaram gene para a produção de Stx. Em 17 das STEC foi possível identificar o tipo de Stx produzida, através de ensaio imunocromatográfico, sendo que todas apresentaram os genes correspondentes à toxina identificada, com exceção de uma cepa de carcaça que foi positiva para a produção de ambas as toxinas, mas apresentando apenas o gene *stx*<sub>2</sub>. Através da análise por PFGE, observou-se a

disseminação e permanência de cepas STEC entre os animais. Dentre as 50 cepas STEC, 28% foram positivas para a variante Stx2d ativável e das 21 cepas *eaeA*-positivas apenas em 8 foram detectadas variantes desse gene, sendo 7 positivas para *eae-γ* e a outra cepa positiva para *eae-β*. Através dos resultados obtidos, podemos dizer que a pesquisa do gene *uidA* pode ser considerada uma ótima ferramenta na triagem de isolados do sorotipo O157:H7. Por outro lado, o gene *ehxA* e a produção de Eh não se mostraram como bons marcadores para pesquisa de cepas Stx positivas. Houve uma ampla diversidade de sorotipos/sorogrupos entre as cepas STEC típicas. É importante salientar que, neste estudo, STEC O157:H7 foi detectada pela primeira vez no Brasil em amostra de carcaça de bovino criado em confinamento. A detecção de cepas STEC em amostras de fezes e principalmente em amostras de carcaças de bovinos demonstra um potencial risco à saúde pública, uma vez que tais cepas podem contaminar e chegar viáveis ao produto final.

## Abstract

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) are considered important foodborne pathogens that have the intestinal tract of ruminants, in particular cattle, as reservoir. These microorganisms are associated with severe human diseases as hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS). The aims of this research were to evaluate the occurrence of STEC from different sources during the feedlot cattle breeding and slaughtering; detecting the presence of *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA* and *eaeA* genes; identifying O157:H7 strains through *uidA*; evidencing Stx and Eh production capacity; identifying *stx* and *eaeA* variants and determining STEC strains serotypes and genetic diversity. The potentially pathogenic strains were screened by detection of *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *eaeA* and *uidA*, and Eh production, amongst 628 isolates studied. Fifty isolates were identified as STEC and 12 others as atypical EPEC. Among the STEC isolates, 76% were from feces, 18% from carcasses and 6% from water samples. Six strains isolated from feces and one from carcass were serotyped as O157:H7, all being positive for the *uidA*. No other serogroup linked to outbreaks or sporadic cases of HC and HUS were found. From the 30 strains that showed cytotoxic effect on Vero cells, the great majority (96.7%) was positive for *stx*. Using an immunochromatographic assay, it was possible to identify the type of Stx produced by 17 out of the 50 STEC strains. All but one of these strains harbored the gene correspondent to the identified toxin. The other strain, even though producing both toxins, presented only *stx*<sub>2</sub>. It was possible to determine by PFGE the dissemination and persistence of STEC strains among the animals. 14/50 (28%) STEC strains were positive for the variant Stx2d activatable. Amongst 21 *eaeA*-positive strains, the variants of this gene were detected only in eight, being seven positive for *eae*- $\gamma$  and the other *eae*- $\beta$ . The results showed that *uidA* gene can be considered an excellent tool for screening O157:H7 strains. On the other hand, *ehxA*

and Eh production, could not be considered as good markers for Stx-positive strains detection. A great diversity of serotypes/serogroups was observed among typical STEC strains. It is important to notice that this is the first report of O157:H7 strains in carcasses from feedlot cattle in Brazil. The detection of STEC strain in fecal samples and in carcasses from feedlot cattle evidences the potential public health risk, once these strains can contaminate the final product.

## 1. INTRODUÇÃO

### **Família Enterobacteriaceae**

A família Enterobacteriaceae é composta por bacilos Gram negativos não formadores de esporos, que em geral possuem uma proporção G + C de 39 a 59% (Holt *et al.*, 1994). A maioria é habitante do trato intestinal dos animais de sangue quente, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecções, embora possam ser encontrados também amplamente distribuídos na natureza (Bopp *et al.*, 2003).

Os gêneros mais conhecidos da família são: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Yersinia* (Bopp *et al.*, 2003).

A diferenciação entre estes gêneros bacterianos pode ser realizada por meio de uma série de testes bioquímicos, porém espécies pertencentes a um mesmo gênero podem ser extremamente semelhantes, sendo necessário grande número de testes para diferenciá-las, tornando o custo da análise elevado (Kuhnert *et al.*, 2000). Além disso, os resultados de testes bioquímicos podem apresentar variabilidade causada pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica e pelo risco de interpretações e identificações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes (Farber *et al.*, 2001).

### ***Escherichia coli* (*E. coli*)**

O gênero *Escherichia* é encontrado como parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente e compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hemanii* e *Escherichia vulneris* (Holt *et al.*, 1994). Entretanto, a espécie de maior importância em microbiologia de alimentos é sem dúvida a *Escherichia coli* (Bopp *et al.*, 2003).

A descrição da espécie *E. coli* foi feita por Theodor Escherich em 1885, que a identificou como *Bacterium coli commune* e como principal agente da diarreia. Em 1958, em homenagem ao descobridor, foi oficialmente aceita a nomenclatura atual (Kuhnert *et al.*, 2000) e desde então *E. coli* tem sido reconhecida como um importante patógeno humano (Bell, 2002).

*E. coli* são bacilos de 1,1 – 1,5 µm x 2,0 – 6,0 µm que ocorrem isoladamente ou em pares, anaeróbios facultativos e a temperatura ideal para o seu desenvolvimento é 37°C. Podem apresentar motilidade através de flagelos peritríquios, são capazes de metabolizar glicose e outros carboidratos com formação de ácido e gás, tanto em aerobiose como em anaerobiose; não produzem oxidase, mas produzem catalase (Holt *et al.*, 1994).

*E. coli* é sem dúvida, o mais importante componente da microbiota intestinal de humanos e outros mamíferos, dentre as anaeróbias facultativas, e exerce papel importante na manutenção da fisiologia destes, sendo que a colonização do intestino ocorre poucas horas após o nascimento (Bell, 2002).

Existe uma grande diversidade de cepas de *E. coli* comensais, pertencentes a diferentes sorotipos, e estas cepas são constantemente excretadas no ambiente podendo contaminar alimentos de origem animal ou vegetal, assim como superfícies e águas de recreação, geralmente sem nenhum efeito adverso à saúde humana (Kuhnert *et al.*, 2000). Porém, a presença de *E. coli*, mesmo não patogênica, no ambiente e, principalmente em alimentos e reservatórios de água, requer atenção especial, pois é indicativa de falta de higiene. Quando estas cepas são patogênicas, este indicativo torna-se um alerta de perigo à saúde pública (Kuhnert *et al.*, 2000).

As cepas de *E. coli* da microbiota intestinal que normalmente são inócuas ao hospedeiro, podem se tornar patógenos oportunistas. Isso pode ocorrer após uma ruptura traumática das barreiras naturais entre o intestino e outros sítios do corpo normalmente estéreis ou mais freqüentemente, quando o sistema imune está

debilitado, não sendo capaz de conter as cepas comensais em seu ambiente natural ou ainda, após intervenções cirúrgicas. Essas cepas também podem fazer parte de infecções mistas, quando um patógeno primário rompe as defesas locais do hospedeiro, permitindo que cepas de *E. coli* também sejam responsáveis pela infecção (Nataro e Kaper, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000).

O genoma de *E. coli* é considerado extremamente flexível, isto é, ele perde e ganha genes de virulência com relativa frequência. Essa flexibilidade deve-se ao fato de a maioria dos genes de virulência em *E. coli* estarem localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas (Kuhnert *et al.*, 2000). Sendo assim, *E. coli* pode tornar-se um patógeno através da aquisição de fatores de virulência contidos nestes elementos genéticos (Coombes *et al.*, 2008), tanto por transferência intra-específica como também inter-específica (Kuhnert *et al.*, 2000).

Portanto, algumas cepas de *E. coli* são consideradas patógenos primários, por apresentarem em seu genoma fatores de virulência (Kuhnert *et al.*, 2000). Essas cepas adquiriram genes de virulência, principalmente para produção de toxinas, fatores de invasão e de colonização (Holt *et al.*, 1994), os quais conferem uma maior habilidade de adaptação a novos nichos e permitem que elas causem diversas doenças (Kaper *et al.*, 2004). Estes patógenos são conhecidos como patótipos (Kaper *et al.*, 2004) e são classificados dentro de duas categorias: os patógenos entéricos ou diarreicos e os patógenos extra-intestinais (Kuhnert *et al.*, 2000). Neste segundo grupo estão importantes causadores de infecções do trato urinário e de infecções nosocomiais, inclusive septicemia e meningite (Holt *et al.*, 1994; Kaper *et al.*, 2004). Em pacientes imunocomprometidos, crianças e idosos, algumas das patologias causadas por *E. coli* podem levar à morte (Doyle *et al.*, 1997). As *E. coli*, consideradas patógenos entéricos, serão discutidas posteriormente.

A identificação bioquímica de *E. coli* não permite diferenciar se uma cepa é ou não patogênica. Para que essa diferenciação seja feita, há necessidade de caracterizar seus fatores de patogenicidade para, então, classificá-las e distingui-las dos membros não patogênicos da espécie (Nataro e Kaper, 1998).

A sorotipificação, proposta pela primeira vez por Kauffmann em 1944, tem sido utilizada como importante ferramenta na caracterização de *E. coli*, e está baseada na reação antígeno-anticorpo de anti-soros preparados contra os antígenos (Ag) O (somático), K (capsular) e H (flagelar) (Edwards, 1986). Essa metodologia é utilizada

até os dias de hoje, com algumas modificações, sendo atualmente reconhecidos 174 Ag O (Scheutz *et al.*, 2004), 100 Ag K e 53 Ag H (Orskov e Orskov, 1992). Internacionalmente os sorotipos são designados por números arábicos, colocados em seguida a cada letra representativa do antígeno, como por exemplo, O26:K60:H11 (Bopp *et al.*, 2003).

Nem todo o isolado de *E. coli*, independente de sua origem, expressa os três antígenos simultaneamente. Assim, uma porcentagem variável de isolados é rugosa e, portanto, não possui antígeno O e outras tantas são imóveis, não possuindo flagelos. Em consequência dessa variação, a identificação sorológica de *E. coli* é freqüentemente incompleta, já que pode basear-se apenas no antígeno O e/ou H (Campos e Trabulsi, 2004; Meng *et al.*, 2001).

Deve-se ressaltar que o termo sorotipo é reservado para designar isolados cujos antígenos O e H são identificados. Deste modo, pode-se ter sorotipos O:K:H, ou somente O:H, quando a cepa é desprovida do Ag K. Em se tratando de amostra imóvel, ela é, geralmente, designada como sorotipo imóvel e depois da designação do Ag H é colocado o sinal negativo (H-) (Bopp *et al.*, 2003; Kuhnert *et al.*; 2000).

### **Grupos enteropatogênicos**

A característica melhor conservada em cepas enteropatogênicas de *E. coli* é a habilidade de colonizar a superfície da mucosa intestinal, vencendo o peristaltismo e a competição por nutrientes com a microbiota normal, inclusive outras cepas de *E. coli* (Nataro e Kaper, 1998). Normalmente a infecção limita-se à mucosa, mas dependendo do estado fisiológico do indivíduo, pode haver disseminação para outros órgãos (Campos e Trabulsi, 2004). Exceção deve ser feita para as *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC), as quais atingem também, indiretamente, outras partes do corpo humano além do trato gastrointestinal, através de translocação da toxina (Kuhnert *et al.*, 2000).

As cepas de *E. coli* consideradas como patógenos entéricos são encontradas em perfeita simbiose com cepas comensais (Kuhnert *et al.*, 2000), e podem ser divididas em categorias de acordo com os mecanismos de virulência específicos,

tipo de interação que estas cepas apresentam com linhagens celulares, as síndromes clínicas que desencadeiam e os sorotipos.

Com base nessas características, as *E. coli* podem ser divididas nos seguintes grupos enteropatogênicos (Nataro e Kaper, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000; Kaper *et al.*, 2004; Caprioli *et al.*, 2005):

*E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) – causadoras de diarreia em crianças e adultos de países em desenvolvimento e em adultos de países industrializados que viajam para regiões menos desenvolvidas, causando a “diarreia dos viajantes”. Após a ingestão de alimentos e/ou água contaminados com o microrganismo, este coloniza a mucosa do intestino delgado causando disfunção do transporte de eletrólitos e água. Os principais sintomas são diarreia aquosa e febre baixa;

*E. coli* enteropatogênicas (EPEC) – causadoras de diarreia em crianças menores de dois anos de idade e habitantes de países em desenvolvimento, sendo geralmente transmitida por alimentos e água contaminados. O microrganismo coloniza as microvilosidades de todo o intestino sendo capaz de produzir a lesão característica A/E (*attaching and effacing*) que faz com que as microvilosidades desapareçam, causando sintomas bastante severos: diarreia aquosa profusa, vômito e febre;

*E. coli* enteroagregativas (EAaggEC) – ocorrem principalmente em países em desenvolvimento, mas também são observadas em países industrializados. As EAaggEC apresentam um padrão de aderência típico em cultura celular, com as células alinhadas paralelamente como se fossem “tijolos em uma parede”. Os sinais clínicos são diarreia aquosa e com muco, por vezes contendo sangue, febre baixa, com ou sem vômito. Tipicamente a diarreia é persistente, com duração superior a 14 dias;

*E. coli* enteroinvasivas (EIEC) – são raramente isoladas em países industrializados, sendo mais comum em países em desenvolvimento causando, principalmente, diarreia aquosa e, em casos mais graves, disenteria. As cepas de EIEC são capazes de invadir e destruir os enterócitos, levando a uma intensa inflamação. Podem provocar também diarreia sanguinolenta pela capacidade de invasão e de multiplicação no tecido epitelial do cólon, causando necrose;

*E. coli* difusamente aderentes (DAEC) – têm sido associadas com diarreias persistentes em crianças, principalmente menores de um ano, mas sua epidemiologia e mecanismo de patogenicidade ainda não foram elucidados;

*E. coli* verotoxigênicas, também chamadas de *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (VTEC ou STEC) – são capazes de causar, em humanos, desde diarreia até doenças mais severas como a colite hemorrágica (CH) e a síndrome urêmica hemolítica (SHU) que pode ser fatal. Infecções por STEC ocorrem tipicamente em países industrializados e as formas mais severas da doença são observadas principalmente em crianças e idosos. As STEC colonizam o cólon do intestino, causando necrose nas extremidades das vilosidades, sem entretanto invadir a mucosa intestinal. As STEC incluem todas as cepas produtoras de toxina de Shiga e também as *E. coli* conhecidas como entero-hemorrágica (EHEC), que além de produzirem toxina de Shiga são capazes de produzir a lesão A/E, semelhante às EPEC.

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

Por definição, cepas de STEC compreendem todos os isolados de *E. coli* que produzem toxinas citopáticas semelhantes à toxina identificada pela primeira vez em *Shigella dysenteriae* e por isso chamadas de toxina de Shiga (Stx). Elas são também conhecidas como verotoxinas (VT) devido ao efeito citopático irreversível que o sobrenadante da cultura destes microrganismos causa em culturas de células Vero (Karmali, 1989; Nataro e Kaper, 1998).

As STEC constituem um grupo bioquímico e sorologicamente heterogêneo (De Toni *et al.*, 2004) que inclui as *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC). O subgrupo EHEC compreende todas as cepas de *E. coli* que além de produzirem as toxinas de Shiga (Stx1 e/ou Stx2) também possuem a ilha de patogenicidade LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), responsável pela lesão do tipo A/E (Kaper *et al.*, 2004; Luck *et al.*, 2005; Mainil e Daube, 2005).

EHEC constitui um subgrupo altamente infeccioso para humanos e está fortemente associada com diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica. Em alguns indivíduos, principalmente crianças, estes sintomas podem se complicar e gerar seqüelas neurológicas e renais, inclusive síndrome urêmica hemolítica, que pode levar o indivíduo à morte. Surtos e casos esporádicos de doenças veiculadas por alimentos e causadas por EHEC parecem ser resultado da ingestão de baixas

populações, isto é, <100 células (Caprioli *et al.*, 2005; Vanselow *et al.* 2005; Kaufmann *et al.*, 2006).

As EHEC e as STEC podem ser divididas em linhagens evolutivas baseado em suas propriedades gerais (sorotipos, biotipos e lisotipos) e propriedades específicas (virulência). A linhagem 1 de EHEC, compreende o sorotipo O157:H7 e está estreitamente relacionada com cepas que são altamente patogênicas para humanos e a linhagem 2 de EHEC agrupa todas as outras cepas de diversos sorogrupos (O5, O26, O103, O111, O118, entre outros). Para as STEC, a linhagem 1 agrupa as cepas associadas com o Ag flagelar H21 (O91, O113 e outros) e que são patogênicas para humanos, já as STEC linhagem 2 compreendem todas as cepas não patogênicas ou de baixa patogenicidade para humanos (Mainil e Daube, 2005).

*E. coli* O157:H7, considerado o modelo de EHEC (Tutenel *et al.*, 2003), foi isolado pela primeira vez em 1975 de uma mulher na Califórnia (EUA), mas só foi reconhecido como importante patógeno humano capaz de causar doenças de origem alimentar, a partir de 1982 quando houve o primeiro relato de surto nos Estados Unidos (Riley *et al.*, 1983). Desde então, vários surtos e casos esporádicos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica têm sido reportados mundialmente, causados pela ingestão de alimentos contaminados com este microrganismo (Childs *et al.*, 2006; Erickson e Doyle, 2007).

A questão levantada pelos pesquisadores é se este patógeno sempre existiu e simplesmente não estava sendo diagnosticado ou se realmente é um microrganismo recente. De fato, houve um aumento na frequência de identificação de *E. coli* O157:H7 desde sua descoberta, mas isso não significa que o seu surgimento tenha ocorrido nesta época, uma vez que alguns casos de SHU anteriores ao reconhecimento do sorotipo permaneceram sem a identificação do agente causal (Nataro e Kaper, 1998).

Acredita-se que o antecessor de STEC O157:H7 e de EPEC O55:H7 tenha sido o mesmo e que tenha existido a aproximadamente 4,5 milhões de anos (Vanselow *et al.*, 2005). Como *E. coli* O157:H7 e O55:H7 são geneticamente muito relacionadas, é provável que a primeira tenha evoluído a partir da segunda através da aquisição de genes para a toxina de Shiga e possivelmente outros fatores de patogenicidade, via transferência horizontal e recombinações. Entretanto, ainda é desconhecido como esse evento ocorreu (Bettelheim e Beutin, 2003; Vanselow *et al.*, 2005).

Existem algumas diferenças entre os isolados de *E. coli* O157:H7, e essa diversidade é manifestada nas variações das características fenotípicas, tais como sobrevivência no ambiente e tolerância ao pH.

Algumas cepas de *E. coli* O157:H7 são ácido-tolerantes (Conner e Kotrola, 1995). Essa característica permite que sobrevivam em produtos alimentícios, tais como cidra de maçã (pH 3,7 a 4,0), manteiga (pH 4,3), iogurte (pH 4,17 a 4,39), creme de leite (pH 4,3) (Dineen *et al.*, 1998; Miller e Kaspar, 1994), sucos de frutas, maionese e carnes fermentadas, assim como passem sem danos pelo trato gastrointestinal (Vanselow *et al.* 2005). Zhao *et al.* (1993) evidenciaram que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por até 31 dias em cidra de maçã, quando a população inicial for de  $10^5$  UFC . mL<sup>-1</sup> contudo, outras STEC podem não apresentar essa característica.

Por definição, o sorotipo O157:H7 difere das demais linhagens de *E. coli* por se multiplicar pouco ou não se multiplicar a 44°C, geralmente não fermentar o sorbitol em 24 h e não produzir β-glucuronidase (Gunzer *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2001). Entretanto, já foram isoladas cepas O157 fermentadoras de sorbitol (Gunzer *et al.*, 1992).

Embora o sorotipo O157:H7 seja considerado o mais importante e mais estudado, a ocorrência de infecções causadas por outras STEC não-O157 têm aumentado em muitos países. Mais de 200 sorotipos diferentes de STEC não-O157 têm sido isolados de infecções humanas, sendo que mais de 100 já foram detectados em pacientes com SHU (Bettelheim e Beutin, 2003). Em muitos países, esses sorotipos são mais freqüentemente isolados de pacientes com diarreia e SHU do que cepas O157 (Park *et al.*, 2003; Vaz *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2005).

Tendo em vista que as metodologias laboratoriais normalmente utilizadas, principalmente em laboratórios clínicos, baseiam-se em características específicas do sorotipo O157:H7, doenças causadas por outros sorogrupos não-O157, assim como por cepas O157 fermentadoras de sorbitol provavelmente têm sido sub-relatadas (Bettelheim e Beutin, 2003; Vanselow *et al.* 2005; Kaufmann *et al.*, 2006).

Em 1988 na Bavária, Alemanha, foi identificada pela primeira vez cepa de STEC O157:H- fermentadora de sorbitol, proveniente de amostra de fezes de paciente com SHU (Gunzer *et al.*, 1992). Desde então, esse sorotipo têm sido freqüentemente identificado como um importante causador de doenças em humanos. Relatos indicam que na Alemanha mais de 10% dos casos esporádicos

de SHU são causados por cepas STEC O157:H- fermentadoras de sorbitol (Mellmann *et al.*, 2008).

Dentre os sorogrupos não-O157 mais freqüentemente envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar em todo o mundo, encontram-se O26, O48, O91, O103, O104, O111, O113, O121 e O145, pertencentes principalmente à linhagem 2 de EHEC e à linhagem 1 de STEC (Perelle *et al.*, 2004; Mainil e Daube, 2005; Perelle *et al.*, 2007).

O termo EHEC foi inicialmente criado para denominar *E. coli* O157:H7 responsáveis por CH e SHU. Como nos dias de hoje reconhece-se um grande número de sorotipos também envolvidos nessas doenças, a aplicação da denominação EHEC ficou bastante confusa. Em virtude disso e para facilitar a compreensão deste texto, no restante do trabalho, será utilizada a denominação STEC para englobar todas as cepas produtoras de toxina de Shiga independentemente da presença de LEE.

### **Fatores de patogenicidade de STEC**

Análises genéticas do DNA de *E. coli* O157:H7 mostraram que 20% do cromossomo é constituído de seqüências que não estão presentes no DNA de *E. coli* K12, não patogênica. Esta porção de DNA foi provavelmente adquirida de outras espécies bacterianas através de transferência genética horizontal (Caprioli *et al.*, 2005).

*E. coli* O157:H7 apresenta 1387 novos genes se comparado à *E. coli* K12, incluindo possíveis fatores de virulência, fatores metabólicos, vários pró-fagos e alguns genes de função ainda desconhecida (Vanselow *et al.*, 2005).

Ainda não estão identificados todos os fatores de virulência de STEC, porém alguns já são bem conhecidos e caracterizados, como a toxina de Shiga 1 e 2 (O'Brien e La Veck, 1983), a intimina (Frankel *et al.*, 1998) e a entero-hemolisina (Piérard *et al.*, 1997). Entretanto, sabe-se que mesmo cepas que não produzem intimina e/ou entero-hemolisina podem estar envolvidas em casos de infecções graves (Karmali, 1989).

Outros possíveis fatores de virulência vêm sendo pesquisados, principalmente fatores de aderência, como a proteína ToxB, necessária para a completa expressão da aderência pela cepa O157:H7 Sakai (Tatsuno *et al.*, 2001); Iha, uma proteína que confere aderência similar à proteína IrgA do *Vibrio cholerae* (Tarr *et al.*, 2000); Efa1, um fator de aderência em STEC (Nicholls *et al.*, 2000); e Saa, uma adesina autoaglutinante identificada em cepas LEE-negativas (Paton *et al.*, 2001). Além destes, os genes *kafP* (catalase peroxidase), *espP* (serina protease extracelular) e *stcE* (metaloprotease secretada), também estão sendo avaliados, mas a participação destes na virulência de STEC necessita de confirmações adicionais (Ritchie *et al.*, 2003).

### **Toxina de Shiga**

A primeira descrição de que cepas de *E. coli* poderiam produzir toxinas, que afetavam de forma irreversível culturas de células Vero (células do rim de macacos-verdes), ocorreu em 1977 e em virtude dessa ação as toxinas foram denominadas verotoxinas (Konowalchuk *et al.*, 1977). As verotoxinas também são chamadas de toxinas de Shiga, devido a homologia na seqüência de aminoácidos, estrutura e atividade com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 (Cebula *et al.*, 1995).

Além do sorogrupo O157, outros 400 sorotipos não-O157 têm sido descritos como produtores de toxina, os quais constituem importantes fatores de risco para humanos (Padola *et al.*, 2004).

As toxinas de Shiga são os fatores de virulência primários de STEC (Coombes *et al.*, 2008; Maurer *et al.*, 2008) e apresentam atividade citotóxica além das culturas de células Vero também nas de células HeLa (Pollard *et al.*, 1990). Porém, é importante ressaltar que apesar da grande importância de Stx como fator de virulência, e por isso as STEC serem consideradas potenciais patógenos para os humanos, nem todas as cepas produtoras de Stx são capazes de causar doenças, pois a patogenicidade é multifatorial (Peterson *et al.*, 2007; Coombes *et al.*, 2008).

São reconhecidos até o momento dois grupos de toxina de Shiga denominados Stx1 e Stx2, os quais são antigenicamente distintos e codificados por genes diferentes, mas apresentam a mesma estrutura molecular e atividade biológica (Strockbine *et al.*, 1988; Law, 2000).

Stx1 é praticamente igual à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* sorotipo 1, enquanto Stx2 apresenta homologia de aproximadamente 60% na seqüência de aminoácidos com Stx1. As cepas de STEC podem carrear genes para a produção de uma ou ambas as toxinas, assim como as variantes destas (Smith e Scotland, 1988). A informação genética para a produção de Stx1 e 2 está contida em um bacteriófago integrado no cromossomo de STEC (Caprioli *et al.*, 2005; Spears *et al.*, 2006).

As proteínas Stx são do tipo AB<sub>5</sub>, ou seja, são formadas por uma subunidade A e cinco subunidades B, sendo essas últimas responsáveis pela ligação da toxina aos receptores das células eucarióticas. A subunidade A é responsável pela atividade citotóxica (O'Brien e Holmes, 1987).

A citotoxina é internalizada na célula do hospedeiro por um processo conhecido como endocitose mediada por receptor (Donnenberg e Whittam, 2001), e atua inativando o RNA ribossomal e inibindo a síntese protéica, o que leva à morte da célula hospedeira (Boerlin, 1999; Hoey *et al.*, 2003).

Em humanos, após a ingestão, as células de STEC passam pelo ambiente ácido do estômago e colonizam o intestino através da aderência às paredes deste, principalmente na parte distal do intestino delgado e cólon. Ali o microrganismo produz Stx, que é então internalizada pelas células do hospedeiro e atinge a corrente sanguínea. Na circulação, as Stx permanecem junto aos leucócitos polimorfonucleares e são carregadas até o tecido alvo, onde são transferidas para as células do endotélio microvascular renal (Te Loo *et al.*, 2000) ou do cérebro (Bielaszewska *et al.*, 2005).

Elas são então, transportadas para o retículo endoplasmático, membrana nuclear e núcleo, e a subunidade A da toxina cliva o glicosídeo ligado ao rRNA 28S, levando à interrupção da síntese protéica e à morte celular. Stx tem como alvo os tecidos cujas células expressam o receptor glicolipídico apropriado, Gb<sub>3</sub>, que é reconhecido por sítios da subunidade B da toxina (Vanselow *et al.* 2005).

No rim, a toxina causa danos às células endoteliais, resultando na obstrução dos microvasos e posterior inflamação renal, que pode ocasionar SHU e até mesmo

falência renal. Stx também pode provocar danos ao cólon, o que resulta em diarreia sanguinolenta, necrose e perfuração intestinal (Kaper *et al.*, 2004). No cérebro, causa coágulo e freqüentemente a morte do paciente (Park *et al.*, 1999).

Foi demonstrado que os receptores Gb3 de bovinos estão localizados nas células epiteliais das criptas da submucosa adjacente do trato gastrintestinal (Hoey *et al.*, 2002), porém estes receptores são resistentes à Stx1, em contraste com as células Vero e células do endotélio vascular do rim humano. Nas células que apresentam Gb3 nos bovinos, Stx1 é internalizada e processada pelos lisossomos, sendo possivelmente degradada (Hoey *et al.*, 2003). Este fato explicaria a sintomatologia de diarreia branda ou a ausência de sintomas nos animais, tornando-os simplesmente reservatórios do microrganismo (Elder *et al.*, 2000).

As variantes de Stx1 e Stx2 são definidas de acordo com a variabilidade antigênica, toxicidade diferenciada à células ou animais, capacidade de ser ativada pela elastase de camundongo e pelas diferenças na seqüência do DNA ou de aminoácidos das subunidades A e B da toxina (Paton e Paton 1998; Bettelheim e Beutin, 2003).

Stx1 constitui um grupo particularmente homogêneo, no qual existem apenas duas variantes: Stx1c (Zhang *et al.*, 2002a) e Stx1d (Bürck *et al.*, 2003). Stx1c é a mais comum dentre as variantes de Stx1 e era anteriormente chamada de Stx1OX3 (Zhang *et al.* 2002a).

Stx2 constitui um grupo mais heterogêneo e compreende as variantes Stx2c (Schmidt *et al.*, 1991), Stx2d (Piérard *et al.*, 1998), Stx2e (Weinstein *et al.*, 1988), Stx2f (Schmidt *et al.*, 2000), Stx2d elastase (mucus)-ativável (Stx2d atv.) (Melton-Celsa *et al.*, 1996), Stx2g (García-Aljaro *et al.*, 2006), entre outras que têm sido descritas.

Estudos epidemiológicos têm revelado que Stx2 está mais associada com doenças humanas severas que Stx1 (Caprioli *et al.*, 2005; Mainil e Daube, 2005; Zaki e El-Adrosy, 2007), porém algumas das variantes de Stx2 são menos patogênicas para humanos (Piérard *et al.*, 1998).

As variantes mais frequentemente encontradas em cepas isoladas de pacientes com CH e SHU são Stx2d atv. e Stx2c (Caprioli *et al.*, 2005; Cergole-Novella *et al.*, 2006; Spears *et al.*, 2006; Beutin *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2007). Por outro lado, cepas que produzem Stx1c, Stx2d, Stx2e e Stx2f são usualmente isoladas de casos

de diarreia branda (Caprioli *et al.*, 2005) ou de casos assintomáticos (Piérard *et al.*, 1998; Beutin *et al.*, 2007).

Cepas STEC produtoras de algumas variantes de Stx podem ser associadas às espécies animais como seus principais reservatórios. Assim, aquelas que produzem Stx1c e/ou Stx2d estão associadas com ovinos (Brett *et al.*, 2003b) e caprinos (Vu-Khac e Cornick, 2008), Stx2e com suínos e Stx2f com pombos selvagens (Schmidt *et al.*, 2000).

Cepas que produzem Stx2e são citotóxicas apenas para células Vero (Johnson *et al.*, 1990) e foram por algum tempo consideradas patogênicas somente para suínos. Entretanto, tais cepas principalmente do sorogrupo O101 já foram isoladas de paciente com diarreia e também com SHU, indicando sua patogenicidade também para humanos (Franke *et al.*, 1995). Cepas Stx2e-positivas são o segundo tipo mais frequentemente isolado em amostras ambientais na França, sendo cepas Stx2d-positivas as mais frequentes (Vernozy-Rozand *et al.*, 2004).

Stx2f é uma variante de Stx2 com antigenicidade alterada e produção reduzida (Koitabashi *et al.*, 2006). Stx2d atv., descrita por Melton-Celsa *et al.* (1996), é uma toxina que após ativação por muco intestinal humano ou de camundongo, torna-se mais citotóxica à cultura de células Vero. Essa observação sugere a possibilidade de que STEC produtoras destas Stx podem ser mais virulentas e/ou compensar a ausência de outros fatores de virulência. A substância ativadora no muco de camundongos é uma elastase, que apresenta grande homologia com a elastase IIIB de humanos (Kokai-Kun *et al.*, 2000).

Bielaszewska *et al.* (2006) avaliaram a ativação pelo muco intestinal de camundongos e de humanos de outras Stx produzidas por STEC de isolados clínicos, e concluíram que nenhuma outra Stx, além da Stx2d atv., sofreu alteração na citotoxicidade. Outra observação importante feita pelos pesquisadores foi que as cepas STEC que apresentaram o gene *stx<sub>2datv</sub>*, em sua maioria, foram provenientes de pacientes adultos com SHU, diferente das cepas produtoras de outras Stx2, que normalmente são encontradas em crianças menores de cinco anos de idade também com SHU.

A perda ou transferência do gene *stx* parece ocorrer durante infecções humanas e pode levar a mudanças do tipo patogênico da cepa infectante. Melmann *et al.* (2008) descrevem o isolamento de uma cepa STEC O157:H- positiva para o gene

*stx*<sub>2</sub> a partir de fezes de um paciente com SHU oito dias após o início da diarreia, e que passados três dias da primeira coleta, as fezes passaram a conter *E. coli* O157:H- *stx*-negativo. Esta perda do gene *stx* é de grande importância para os laboratórios de diagnóstico, principalmente quando a coleta é feita em estágio mais avançado da doença. Além disso, prejudica investigações epidemiológicas, uma vez que cepas de *E. coli stx*-negativo isoladas de amostras de fezes não podem ser incriminadas como agente causal de SHU e/ou CH (Melmann *et al.*, 2008).

Toxinas idênticas ou similares às Stx podem ser encontradas em outras espécies bacterianas, como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas* spp. e *Shigella* spp. (Vanselow *et al.* 2005).

### **Ilha de patogenicidade LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*)**

As ilhas de patogenicidade são regiões genômicas grandes (10-200 kb) que estão presentes no genoma de cepas patogênicas de microrganismos, mas ausente em cepas não patogênicas da mesma espécie ou de espécies relacionadas (Kaper *et al.*, 2004). Tais regiões genômicas, constituem um *pool* de genes flexíveis que contribuem para a evolução do patógeno (Frankel *et al.*, 1998), são regiões instáveis do cromossomo e podem ser perdidas espontaneamente (Vanselow *et al.*, 2005).

Algumas cepas de STEC que causam enfermidades em humanos aderem e colonizam o epitélio intestinal de forma similar à EPEC, por apresentarem também a ilha de patogenicidade LEE. Esta é uma adesão localizada que corrompe a função das células epiteliais e induz a uma lesão histopatológica característica das microvilosidades, a lesão A/E (Figura 01) (Jerse *et al.*, 1990).

A lesão do tipo A/E não é diretamente responsável pela diarreia sanguinolenta observada nas infecções causadas por STEC. A ocorrência desse sintoma pode ser explicada por algumas hipóteses: pode ocorrer a inibição da absorção de sódio e cloretos pelas células do intestino; ativação do canal de cloretos nas microvilosidades; aumento da permeabilidade paracelular; produção de outras toxinas; ou resposta inflamatória na mucosa e produção de citocinas (Mainil e Daube, 2005).

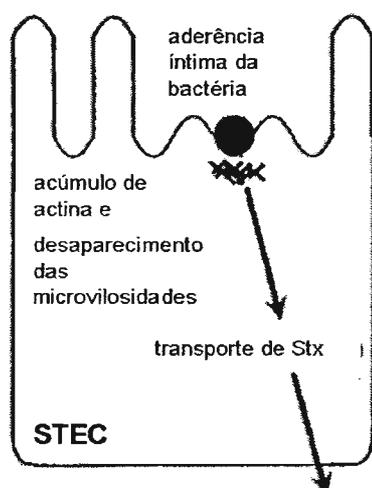


Figura 01 – Esquema demonstrando o tipo de lesão A/E causada por cepas de STEC. Fonte: Nataro e Kaper (1998).

A presença de LEE é detectada pela amplificação de *eaeA* através da utilização de um par de *primers* para a região central do gene, a qual é conservada tanto entre as cepas STEC como EPEC (Hayes *et al.*, 1995).

Dentre os genes presentes em LEE, *eaeA* é um importante marcador de virulência de STEC (Chahed *et al.*, 2006) e codifica a intimina, proteína de membrana externa que promove a adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal (Frankel *et al.*, 2001).

O gene *eaeA* aparentemente não é necessário para a virulência das cepas STEC (Paton *et al.*, 1999), entretanto, cepas LEE-positivas estão associadas com doenças humanas mais severas, enquanto STEC LEE-negativas são raramente isoladas de casos de diarreia sanguinolenta e SHU. As poucas exceções relatadas indicam que as cepas LEE-negativas possuem outro mecanismo de adesão e colonização da mucosa intestinal, tão eficiente quanto a adesão A/E (Caprioli *et al.*, 2005; Spears *et al.*, 2006).

Luck *et al.* (2005) compararam *in vitro* as propriedades de aderência de cepas de STEC LEE-negativas com cepas LEE-positivas e verificaram que as cepas LEE-negativas foram internalizadas pelas células epiteliais, ao contrário das cepas LEE-positivas que permaneceram extracelulares. Os pesquisadores sugerem que as cepas LEE-negativas utilizam o mecanismo de invasão das células do hospedeiro para colonizar o epitélio intestinal e compensar a incapacidade de formar a lesão A/E.

LEE é constituída por três módulos funcionais diferentes. O primeiro codifica o sistema de secreção tipo III (TTSS), que exporta moléculas efetoras; o segundo codifica proteínas EspA, B e D, que funcionam como parte do aparato de secreção tipo III e o terceiro módulo codifica uma adesina, a intimina, e o receptor translocado para intimina (Tir), que é transferido para o interior da membrana da célula do hospedeiro pelo TTSS (Caprioli *et al.*, 2005). Tir apresenta dois domínios transmembrana, cuja porção terminal de ambos localiza-se no interior da célula hospedeira e nas porções extracelulares situam-se os sítios de ligação da intimina (Nougayrède *et al.*, 2003).

Após as células bacterianas entrarem em contato com as células da mucosa intestinal, o microrganismo exporta através do TTSS, Tir e EspB para o interior da célula epitelial através de uma proteína temporária de transporte, a EspA. Ocorre então, uma série de alterações no citoesqueleto celular, resultando no desaparecimento das microvilosidades, formação do pedestal, que será o local de ligação da bactéria, e acúmulo de actina polimerizada diretamente abaixo da bactéria aderida. A seguir, a intimina liga-se à Tir, formando a ligação íntima característica de microrganismos LEE-positivos (Peterson *et al.*, 2007). A expressão dos genes que codificam estas proteínas é fortemente influenciada pela presença de íons bicarbonato (Vanselow *et al.* 2005).

A intimina é uma proteína de 94 kDa (Law, 2000), que apresenta variantes antigênicas distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ , e  $\kappa$ ) (Zhang *et al.*, 2002b), que podem indicar a origem filogenética das STEC (Pradel *et al.*, 2008) e que têm mostrado tropismos por determinados tecidos no hospedeiro. Por exemplo, a variante  $\gamma$ , expressa por STEC O157:H7, demonstra tropismo pelo epitélio do intestino humano associado às placas de Peyer (Fitzhenry *et al.*, 2002).

As variantes  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ , e  $\kappa$  são raramente associadas com cepas provenientes de infecções humanas graves (Zhang *et al.*, 2002b).

Zhang *et al.* (2002b) estudaram a diversidade genética do gene *eaeA* em cepas de *E. coli* e através dos resultados obtidos os autores propuseram um valor de corte inferior a 95% de similaridade entre as bases dos genes para definir uma nova variante de intimina, valores acima deste devem caracterizar subgrupos (por exemplo:  $\zeta_1$ ,  $\zeta_2$  e  $\zeta_3$ ).

Um número maior de variantes de intimina é encontrada em isolados provenientes de ruminantes, enquanto isolados provenientes de casos clínicos, apresentam apenas poucas variantes (Vanselow *et al.* 2005).

Na literatura são encontradas diversas designações para as variantes de *eaeA*, o que causa certa confusão e dificulta a comparação dos dados de diferentes fontes.

### Entero-hemolisina

Dentre as categorias de *E. coli*, tanto as uropatogênicas como as enteropatogênicas podem produzir quatro tipos distintos de hemolisina, que são classificadas conforme a fase de desenvolvimento bacteriano em que são sintetizadas e o tipo de eritrócito que lisam.

A  $\alpha$ - e a  $\beta$ -hemolisina são produzidas na fase logarítmica, enquanto a  $\gamma$ - e a entero-hemolisina são produzidas na fase estacionária. A  $\alpha$ - e a  $\beta$ -hemolisina provocam hemólise em eritrócitos de cavalo, coelho e ovelha, enquanto a  $\gamma$ -hemolisina e a entero-hemolisina lisam eritrócitos de cavalo e ovelha e ovelha e coelho, respectivamente (Bhakdi *et al.*, 1986).

A entero-hemolisina de *E. coli* está relacionada, mas não é idêntica, à  $\alpha$ -hemolisina, havendo 60% de homologia em suas seqüências (Feng e Monday, 2000). Ambas apresentam massa molecular similar, são termolábeis e são obtidas no sobrenadante da cultura das bactérias. Porém, diferentemente da  $\alpha$ -hemolisina, a entero-hemolisina não necessita de íons cálcio para sua ativação, estabilidade e ação na membrana dos eritrócitos (Chart *et al.*, 1998).

A produção de  $\alpha$ -hemolisina pode ser detectada após três horas de incubação em meio de cultura apropriado, enquanto a entero-hemolisina necessita de uma incubação *overnight* (Beutin, 1991). O gene responsável pela expressão da  $\alpha$ -hemolisina,  $\alpha$ -*hlyA*, normalmente é encontrado em cepas de *E. coli* uropatogênicas (Nataro e Kaper 1998).

O gene que codifica a entero-hemolisina em STEC é denominado por alguns pesquisadores como *ehxA* (Nataro e Kaper, 1998; Feng e Monday, 2000; Bouvet *et*

*al.*, 2001; Padola *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2006; Vaz *et al.*, 2006), enquanto outros o denominam como EHEC-*hly* ou E-*hly* (Paton e Paton, 1998; Urdahl *et al.*, 2003; Padola *et al.*, 2004; Caprioli *et al.*, 2005; Rigobelo *et al.*, 2006b; Aldick *et al.*, 2007) e está contido em um plasmídeo de virulência de aproximadamente 60 MDa. A seqüência de nucleotídeos deste plasmídeo demonstra que ele codifica 35 proteínas, algumas das quais estão provavelmente envolvidas na patogenicidade do microrganismo (Nataro e Kaper, 1998; Caprioli *et al.*, 2005).

A síntese de entero-hemolisina está associada à produção de Stx 1 e/ou 2 em isolados de STEC tanto de origem humana como animal (Mainil e Daube, 2005), e raramente está associada a outras cepas de *E. coli*, o que sugere que a entero-hemolisina pode ser utilizada como um marcador para cepas STEC (Beutin, 1991). A grande maioria das cepas O157:H7, e uma ampla quantidade de cepas STEC não-O157, são positivas para a produção de entero-hemolisina (Nataro e Kaper, 1998).

A entero-hemolisina é uma proteína de 110 kDa que atua destruindo eritrócitos, leucócitos, células endoteliais, granulócitos, monócitos e linfócitos T humanos, através da formação de pequenos poros (Mainil e Daube, 2005).

A participação da entero-hemolisina na virulência de cepas de STEC ainda não está esclarecida (Chahed *et al.*, 2006) e parece não ser necessária para o desenvolvimento de SHU (Hazarika *et al.*, 2004).

## **Infecções por STEC**

Diversos fatores podem influir na capacidade de STEC em causar doença em humanos, cabendo destacar a idade e estado imunológico do hospedeiro além da habilidade do microrganismo em produzir fatores de patogenicidade como entero-hemolisina e intimina (Kawano *et al.*, 2008). Porém, antes de tudo, para que o microrganismo cause infecção é necessário que o mesmo apresente habilidade para sobreviver ao baixo pH do estômago (Diez-Gonzalez e Russel, 1999).

Após a ingestão do microrganismo, o período de incubação é de três a quatro dias, durante o qual ocorre a colonização do intestino (Doyle *et al.*, 1997). A CH é caracterizada pelo aparecimento repentino de fortes dores abdominais, seguida de diarreia aquosa não sanguinolenta, podendo ocorrer febre de curta duração e

vômitos. Após um ou dois dias a diarreia passa a conter sangue com aumento das dores abdominais. Na maioria dos casos os sintomas são autolimitados durando por volta de uma semana (Doyle *et al.*, 1997), mas em aproximadamente 10% dos pacientes, principalmente crianças e idosos (chegando a até 30% em alguns surtos), a doença pode progredir para SHU (Nataro e Kaper, 1998).

A SHU é a principal causa de falência renal em crianças (Caprioli *et al.*, 2005) e é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal (Nataro e Kaper, 1998), quadro este que requer diálise e transfusões de sangue e cuja taxa de mortalidade pode chegar a 10% (Bell, 2002). Alguns indivíduos podem exibir sintomas neurológicos podendo até mesmo ocorrer derrame cerebral (Vanselow *et al.*, 2005).

A púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) é uma doença também associada com STEC e compartilha algumas características com a SHU, tais como a trombocitopenia, a anemia hemolítica e, em grau variado, sintomas renais e neurológicos. Entretanto, há algumas diferenças clínicas importantes, na TTP os sintomas abdominais são comuns e a febre é mais proeminente (Tarr, 2009).

No Brasil existem poucos relatos de infecções causadas por STEC. Guth *et al.* (2002b) relataram pela primeira vez um caso de paciente com SHU causada por STEC. Em março de 2001 um menino de oito meses de idade do nordeste do Brasil foi admitido na emergência de um hospital em São Paulo, com sintomatologia que se agravou para falência renal. A criança foi diagnosticada como portadora de SHU, e da cultura de suas fezes foi identificada *E. coli* produtora de entero-hemolisina e de Stx1. A presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e *eaeA* foi confirmada por PCR e a cepa foi sorotipificada como *E. coli* O26:H11.

Em um estudo realizado por Vaz *et al.* (2004) foram analisadas 2607 isolados de *E. coli* provenientes de pacientes com diarreia do Estado de São Paulo, entre os anos de 1976 e 1999. Foram identificadas 29 cepas como STEC, com predomínio dos sorotipos O111 e O26. Os autores descreveram também, pela primeira vez no Brasil, a associação de outros sorotipos tais como O55:H19, O93:H19 e O118:H16, em infecções humanas.

Em nosso país, o sorotipo O111:H- é o mais freqüente dentre as cepas de STEC isoladas de casos de diarreia (Guth *et al.*, 2002a), enquanto o sorotipo O26:H11, é considerado o segundo mais freqüente (Guth *et al.*, 2002b).

Irino *et al.* (2002) relataram pela primeira vez no Brasil o isolamento de três cepas de *E. coli* O157:H7 associadas com doença humana no Estado de São Paulo. A primeira foi identificada entre as cepas da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil) em um estudo retrospectivo. Essa cepa havia sido isolada em 1990 de um paciente de 18 anos com diarreia e portador do vírus HIV. As outras duas cepas foram isoladas em 2001, uma de uma menina de quatro anos de idade e que apresentava diarreia sanguinolenta e a outra de um adulto com diarreia severa. As cepas foram caracterizadas como sendo não fermentadoras de sorbitol, contendo seqüências dos genes *stx*<sub>2</sub> e *eaeA* e produtoras de entero-hemolisina.

Santos *et al.* (2007) relataram um caso de um adolescente morador da cidade do Rio de Janeiro que foi internado em um hospital daquela cidade, com sintomas de diarreia mucosanguinolenta e cólicas abdominais intensas. Da cultura de suas fezes foi isolada *E. coli* O157:H- produtora de toxina de Shiga e como alimento suspeito os pesquisadores identificaram a salada preparada na cantina da escola onde o jovem estudava. Porém, o resultado da análise microbiológica da matéria-prima da salada sugere que a contaminação ocorreu durante o preparo da refeição.

Também em 2007, Souza *et al.* relataram um caso de SHU em uma criança de 19 meses de idade de cuja cultura de fezes foi identificada *E. coli* O165:H- carreadora dos genes *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub> e *eaeA*. Segundo os pesquisadores, a origem da doença não foi traçada, entretanto houve o relato de que a criança havia comido queijo feito em casa, que pode ter sido a fonte do agente etiológico.

Ao contrário do que ocorre no Brasil, na Argentina a incidência de casos de SHU é bastante elevada (300 – 400 casos por ano), sendo que STEC O157:H7 têm sido relatada como o principal agente causal. Isolados não-O157 também têm sido encontrados em amostras de animais e alimentos daquele país e alguns deles têm sido envolvidos em casos de CH e SHU (Padola *et al.*, 2002).

Nas infecções por STEC o diagnóstico rápido é muito importante para o tratamento tanto de CH como de SHU. A identificação do sorotipo e, se possível, a avaliação da capacidade do isolado produzir Stx, são análises importantes para o tratamento eficaz da infecção (Koitabashi *et al.*, 2006).

Para essas infecções não é, de maneira geral, aconselhável o uso de antibióticos para o tratamento, pois estes podem causar a lise bacteriana e, assim,

promover uma maior liberação de Stx e/ou causar o aumento da expressão dos genes responsáveis pela produção da toxina. Além disso, muitos isolados apresentam resistência a alguns antimicrobianos (Mora *et al.*, 2005).

Entretanto, alguns estudos revelaram que a administração de certos antimicrobianos já no início da infecção pode prevenir que a doença progrida para SHU (Fukushima *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 1999).

A propagação no ambiente de isolados STEC resistentes a agentes antimicrobianos pode ser decorrente do uso destes agentes na terapia ou profilaxia de infecções e também como promotores do crescimento dos animais (White *et al.*, 2002).

Acredita-se que humanos possam desenvolver imunidade para O157:H7 (Vanselow *et al.*, 2005). Em um surto de infecção causado por O157:H7 veiculada pelo sistema de água em uma zona rural dos Estados Unidos, no verão de 1998, o número de adultos residentes naquela área que desenvolveu infecção foi bem menor que o número de crianças e de visitantes. Este fato foi justificado pela aquisição de certa imunidade devido à exposição contínua ao patógeno (Olsen *et al.*, 2002).

Koitaishi *et al.* (2006) sugerem uma hipótese para a baixa incidência de infecções por STEC em países em desenvolvimento. Os pesquisadores afirmam que cepas STEC Stx2-negativas podem atuar como uma vacina atenuada natural contra infecções por *E. coli* O157:H7/H-, uma vez que são capazes de causar infecções assintomáticas. Sendo assim, a hipótese dos autores é que os habitantes daqueles países consomem frequentemente alimentos e água que apresentam contaminação por STEC Stx2-negativas em concentrações suficientes para causar uma infecção assintomática e portanto, tornaram-se imunes às infecções por STEC.

A origem mais comum das infecções por STEC é o consumo de água ou de alimentos crus ou mal cozidos contaminados com o patógeno. As infecções podem também resultar do contato direto com animais e/ou suas fezes e do contato humano-humano (Kaufmann *et al.*, 2006; Strachan *et al.*, 2006). Uma variedade de alimentos pode estar envolvida como fonte de infecção por STEC, podendo citar hortaliças, frutas, salames, queijos e leite cru, entre outros, mas a carne bovina tem sido considerada a principal fonte de STEC em casos de doenças em humanos (Perelle *et al.*, 2007). Além desses alimentos, alimentos ácidos como cidra de maçã,

manteiga, iogurte e creme de leite também têm sido incriminados (Dineen *et al.*, 1998; Miller e Kaspar, 1994).

### **Contaminação dos alimentos**

As STEC têm como reservatórios diversos animais de sangue quente, entre eles bovinos, ovinos, coelhos e macacos, com destaque para os ruminantes (Yilmaz *et al.*, 2006), e ainda cavalos, cães, gatos (Gun *et al.*, 2003), cervos, moscas e aves (Kaufmann *et al.*, 2006).

Os bovinos, considerados reservatórios primários tanto de O157 como dos demais sorogrupos de STEC, freqüentemente carregam o microrganismo sem demonstrar sintomatologia (Rigobelo *et al.*, 2006b). Apesar dos bovinos serem considerados reservatórios primários de *E. coli* O157:H7, a freqüência de detecção deste sorotipo em suas fezes é baixa, pois a eliminação do microrganismo é considerada um evento transitório (Maurer *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que as cepas de STEC provenientes de animais e de alimentos pertencem a uma gama bastante grande de sorotipos (Blanco *et al.*, 1997; Piérard *et al.*, 1997; Pradel *et al.*, 2000). Por outro lado, apenas um número limitado de sorotipos tem sido associado com casos de doenças em humanos (Pradel *et al.*, 2008).

Em estudos onde se caracterizou STEC de bovinos foram detectados mais de 400 sorotipos (Pradel *et al.*, 2000; Hornitzsky *et al.*, 2002; Brett *et al.*, 2003b; Djordjevic *et al.*, 2004; Bettelheim *et al.*, 2005).

Dentre os fatores que podem influenciar a microbiota do intestino de bovinos, a composição e a excreção, podemos citar a idade dos animais (Zweifel *et al.*, 2005), a dieta e o sistema de criação (Fegan *et al.*, 2004), assim como a sazonalidade (Bonardi *et al.*, 2001).

Em países de clima temperado a presença de *E. coli* O157:H7 nas fezes de bovinos é maior durante os meses quentes do ano, mas nos demais meses o microrganismo também é isolado. Verifica-se também naqueles países que a incidência de infecções alimentares por este grupo de bactérias também é geralmente maior nos meses de verão (Vanselow *et al.*, 2005; Alam e Zurek, 2006).

Os fatores que contribuem para esta sazonalidade são desconhecidos, porém supõe-se que o maior movimento de vetores, tais como aves, insetos e roedores, assim como a melhor possibilidade de sobrevivência do microrganismo no ambiente possam estar relacionados a este fenômeno (Vanselow *et al.*, 2005). *E. coli* O157:H7 pode sobreviver longos períodos no ambiente de criação de bovinos, como no piso de cimento de baias ou em pastagens (Maurer *et al.*, 2008).

Os bovinos podem eliminar nas fezes até  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de *E. coli* O157:H7, e esta população elevada pode levar à contaminação do couro dos animais, principalmente em situações de alta densidade, tais como o transporte ou o ambiente de confinamento (Arthur *et al.*, 2007). Além disso, *E. coli* O157:H7 também já foi isolada da cavidade oral de bovinos (Woerner *et al.*, 2006).

Algumas estratégias para minimizar a ocorrência de STEC O157:H7 nos bovinos vêm sendo estudadas, entre elas estão o uso de probióticos, colicinas, bacteriófagos, antibióticos, vacinas e anticorpos na ração animal, entre outras (Vanselow *et al.*, 2005).

Alonso *et al.* (2007) avaliaram a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em caminhões utilizados para o transporte de bovinos em Oklahoma, EUA. O patógeno foi encontrado em todos os caminhões que não haviam sido lavados antes do embarque dos animais. Os pesquisadores concluíram que o transporte pode ser considerado um ponto crítico na contaminação dos animais e conseqüentemente das carcaças e sugerem a lavagem dos mesmos entre o transporte de lotes para reduzir a freqüência de *E. coli* O157:H7.

A contaminação das carcaças e do ambiente de abate com STEC O157:H7 proveniente do conteúdo intestinal de bovinos é um dos fatores de risco mais importantes na sua transmissão para humanos (Gun *et al.*, 2003). Essa contaminação ocorre quando boas práticas de produção não são empregadas e há o extravasamento do conteúdo intestinal dos animais durante o abate (Yilmaz *et al.*, 2006). A contaminação ainda pode ocorrer pelo contato das carcaças com o couro dos animais (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Nou *et al.*, 2003; Bosilevac *et al.*, 2004; Varela-Hernández *et al.*, 2007).

Uma outra fonte de contaminação das carcaças por O157:H7 pode ser, segundo Stoffregen *et al.* (2004) e Jeong *et al.* (2007), a vesícula biliar. Segundo esses pesquisadores os animais podem apresentar o patógeno neste órgão e, no

abate, ele poderia ser disseminado para a carcaça. Já os estudos de Reinstein *et al.* (2007) indicam que a vesícula biliar de bovinos não é um local comum para permanência de *E. coli* O157:H7, não sendo portanto considerado significativo para a contaminação das carcaças nos abatedouros.

Apesar de se empregar a lavagem das carcaças com o objetivo de reduzir a contaminação, Stopforth *et al.* (2006) sugerem que este procedimento, se realizado na pré-evisceração, pode ser considerado como uma das origens da contaminação por STEC. Já se aplicado pós-evisceração pode ser mais efetivo, principalmente se combinado com o uso de ácidos orgânicos, dentre eles o ácido láctico. A eficiência do emprego de solução de ácido láctico na eliminação de *E. coli* O157:H7 de carcaças é dependente da temperatura da solução, modo de aplicação e tempo de exposição (Erickson e Doyle, 2007).

As cepas STEC podem sobreviver por períodos longos no ambiente de abate em superfícies de aço inoxidável ou plástico (Erickson e Doyle, 2007). Desta forma a contaminação das carcaças ou cortes pode ocorrer por contaminação cruzada via equipamentos e utensílios utilizados durante o corte, resfriamento, estocagem e distribuição. Avery *et al.* (2004) afirmam que a contaminação cruzada pode também ocorrer durante o preparo para o consumo, inclusive sendo causada pelos manipuladores.

A possibilidade de portadores humanos de STEC também serem fonte de contaminação dos alimentos foi verificada por Stephan *et al.* (2000). Eles isolaram 47 cepas de STEC de amostras de fezes de 47 trabalhadores saudáveis de três indústrias processadoras de carne na Suíça e através da PCR, detectaram a presença do gene para Stx em 3,5% das 5590 amostras de fezes pesquisadas.

A importância dos utensílios na contaminação cruzada foi verificada por Matticka *et al.* (2003). Eles observaram que o processo de lavagem utilizado nas cozinhas domésticas, para limpeza de utensílios, não é suficiente para eliminar *E. coli* O157:H7 presente em superfícies contaminadas. Nesse estudo 100% dos pratos contaminados com  $10^3$  UFC de *E. coli* O157:H7 e lavados com água a 38 – 48°C contendo 0,12% (v/v) de detergente, permaneceram contaminados. Eles verificaram ainda que a esponja utilizada na lavagem e o pano de prato empregado para secagem também tornaram-se contaminados.

Nos abatedouros, não existe um procedimento de higienização específico para eliminar STEC, tanto das carcaças como do ambiente de processamento. Entretanto, boas práticas de manipulação assim como a implementação do sistema HACCP (“Hazard Analysis and Critical Control Points” – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) têm contribuído para a redução da contaminação das carcaças por STEC (Caprioli *et al.*, 2005; Vanselow *et al.*, 2005).

Assegurar que o transporte de animais vivos e de carcaças seja feito em veículos mantidos em boas condições higiênicas; evitar que o conteúdo intestinal extravase durante a evisceração; empregar sistemas de descontaminação de carcaças; aplicar o resfriamento imediato de carcaças limpas; aplicar sistemas de monitoramento para detectar e controlar origens de contaminação, são exemplos de medidas efetivas para minimizar a contaminação em linhas de processamento de carnes (Bell, 2002).

Assim como em outras linhas de produção de alimentos, no processamento de bovinos de corte, a detecção de *E. coli* genérica é utilizada, já há muitos anos, como um indicador de contaminação fecal. Os níveis de contaminação das carcaças por essa bactéria podem aumentar ou diminuir durante o processamento de acordo com alguns fatores, como o nível de contaminação fecal do animal vivo, eficiência do processo de evisceração e as práticas higiênicas no abatedouro (Rigobelo *et al.*, 2006b).

Entretanto, em um trabalho realizado na Argélia, verificou-se que não houve relação entre a população de *E. coli* e a identificação de STEC O157, sendo que as amostras positivas para este microrganismo não foram as que apresentaram maior contaminação por *E. coli* genérica (Chahed *et al.*, 2006).

A contaminação de outros alimentos por STEC, como queijos, leite, hortaliças e frutas pode ocorrer através de contato direto com fezes contaminadas ou indireto durante a irrigação, ou ainda em processos que utilizam água contaminada por fezes (Strachan *et al.*, 2006).

Após um grande surto de *E. coli* O157:H7 que ocorreu em 1993 nos Estados Unidos, atingindo quatro Estados, o Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture (USDA – Serviço de Segurança e Inspeção Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), declarou em 1994, que carne

crua contaminada com *E. coli* O157:H7, assim como outros produtos alimentícios, deve ser considerada como um produto adulterado e deve receber processamento que elimine o patógeno ou ser destruída. Esta mudança política vem provocando inúmeros *recalls* de produtos alimentícios (Vanselow *et al.*, 2005).

### **Ferramentas utilizadas na identificação e caracterização de STEC**

Atualmente, devido a grande variabilidade de métodos que podem ser utilizados para pesquisa de STEC, há dificuldades em comparar dados de diferentes pesquisas. Por esta razão, Vanselow *et al.* (2005) sugerem que se uniformize as metodologias utilizadas por todo o mundo.

Os métodos de rotina empregados pelos laboratórios para a detecção de *E. coli* O157, baseados em características específicas como a incapacidade de fermentar sorbitol, deixam a desejar quando o patógeno é uma STEC não-O157 ou mesmo quando é uma O157 atípica. Conseqüentemente, metodologias específicas para a caracterização e identificação destes microrganismos necessitam ser pesquisadas e desenvolvidas (Bell, 2002; Bettelheim e Beutin, 2003; Vanselow *et al.* 2005; Kaufmann *et al.*, 2006).

A sorotipificação é uma importante ferramenta na caracterização de *E. coli* desde que pesquisadores, entre 1945 e 1950, descobriram a primeira evidência que certos tipos sorológicos de *E. coli* estavam envolvidos com casos epidêmicos de enterite de recém nascidos. Dentre os três antígenos utilizados na sorotipificação, o antígeno flagelar é tipado somente em poucos laboratórios e o capsular em um número ainda mais limitado quando comparados ao antígeno somático (lipopolissacarídeo). Ainda hoje, o uso do sistema O:H para a sorotipificação, é considerado padrão na tipificação de *E. coli* para taxonomia e epidemiologia e é um pré-requisito para qualquer ação de investigação de surtos e vigilância (Scheutz *et al.*, 2004).

A identificação dos genes de virulência de cepas de *E. coli* contribui significativamente para o entendimento de doenças causadas por este microrganismo e também permite que as cepas sejam divididas, de forma mais

correta, nos grupos enteropatogênicos, do que através apenas da sorotipificação (Schmidt *et al.*, 1993). Isso porque, somente em alguns casos os sorotipos estão extremamente relacionados com categorias específicas de *E. coli* enteropatogênicas, tornando a identificação sorológica raramente suficiente para caracterizar tais cepas, exceção que deve ser feita para o sorotipo O157:H7 (Nataro e Kaper, 1998).

Para a identificação da presença de STEC, provavelmente a maneira mais rápida seja a detecção da produção de Stx ou da presença dos genes associados a esta. Os testes em cultura celular têm sido utilizados como metodologia de referência para a detecção da produção de Stx desde os estudos pioneiros de Konowalchuk *et al.* (1977), porém exigem equipamentos e pessoal especializado. Além disso, há necessidade de neutralização com anti-soros específicos para correta determinação do tipo de Stx, caso contrário não pode ser feita a identificação da toxina (Gentry e Dalrymple, 1980). Isso dificulta seu emprego rotineiro.

Através da PCR é possível evidenciar a presença dos genes que codificam as toxinas, porém, a presença do gene não significa necessariamente que o microrganismo produz a toxina com todas as suas características biológicas e está apto a exportá-la (Bettelheim e Beutin, 2003).

Alguns protocolos de PCR multiplex para detectar fatores de virulência em STEC estão baseados na presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> em combinação ou não com os genes *eaeA* e *ehxA* (Feng e Monday, 2000). Outros protocolos permitem detectar exclusivamente marcadores genéticos específicos para o sorotipo O157:H7 ou genes específicos para o antígeno O, como o *rfbO157*, *rfbO111* e *rfbO113* (Vicente *et al.*, 2005).

Estas análises têm mostrado que existe diversidade genética entre cepas ou sorotipos de STEC. Portanto, para uma caracterização mais segura é aconselhável utilizar o maior número de genes possíveis na pesquisa destes microrganismos (Feng e Monday, 2000).

Como marcador molecular para o sorotipo O157:H7, e apesar de não estar diretamente relacionado à patogenicidade da bactéria, pode-se utilizar o gene *uidA*, que codifica a produção de  $\beta$ -glucuronidase em *E. coli*. Cepas O157:H7 apresentam o gene *uidA*, apesar de não exibirem atividade glucuronidásica, porém a seqüência deste gene apresenta uma guanina na posição 92 no lugar de uma timina dos demais sorotipos. Este é um polimorfismo altamente conservado conhecido como

polimorfismo de um único nucleotídeo (*single polymorphism nucleotide* – SNP), e que pode ser detectado por PCR com a utilização de um par de *primers* específico (Cebula *et al.*, 1995). O par de *primers* desenhado para a identificação desta substituição permite detectar além do sorotipo O157:H7, as variantes deste, ou seja, as cepas imóveis, aquelas que fermentam sorbitol e aquelas que apresentam atividade glucoronidásica (Hayes *et al.*, 1995).

Alguns testes rápidos para detecção de Stx vêm sendo avaliados e comercializados, entre eles, o Duopath Verotoxin® (DV) (Merck, Darmstadt, Alemanha), que é um método imunocromatográfico desenvolvido para a detecção de cepas de STEC produtoras de toxina de Shiga em alimentos. Este teste utiliza anticorpos monoclonais para a detecção de Stx1 e Stx2 independentemente, mas no mesmo dispositivo. As toxinas formam um complexo com anticorpos na zona de reação do dispositivo, migram por capilaridade pela membrana e formam um complexo do tipo sanduíche, com anticorpos específicos para Stx1 e Stx2 na zona de detecção (Park *et al.*, 2003).

A utilização de técnicas moleculares na subtipificação de microrganismos para a caracterização e agrupamento dos mesmos, baseada em suas características genóticas tem se tornado cada vez mais comum em laboratórios de saúde pública (Hunter *et al.*, 2005), sendo ferramentas úteis para investigações epidemiológicas de surtos e para o controle e monitoração da disseminação de potenciais patógenos (Bastos *et al.*, 2006).

Das diversas técnicas existentes, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é particularmente bastante utilizada para agrupar diversos patógenos (Hunter *et al.*, 2005). PFGE é a metodologia mais frequentemente utilizada para subtipificar cepas STEC (Childs *et al.*, 2006), sendo considerada *gold standard* para subtipificação, devido seu alto poder de discriminação e reprodutibilidade (Vaz *et al.*, 2006).

A PFGE é um método que foi desenvolvido por Schwartz e Cantor (1984) e que revolucionou a subtipificação pela capacidade de separação precisa e reprodutível de fragmentos de DNA maiores que 40 kb. Ela é uma variação da eletroforese em gel, onde a orientação do campo elétrico aplicado ao gel varia periodicamente (*pulsed*) (Sheneman e Katz, 2003).

O *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos estabeleceu uma rede que atua naquele país e no Canadá denominada PulseNet, para a subtipificação molecular de microrganismos patogênicos de origem alimentar, com o objetivo de desenvolver estudos epidemiológicos. O PulseNet começou em 1996 com 10 laboratórios que subtipificavam apenas *Escherichia coli* O157:H7. Para que os dados enviados pelos laboratórios participantes sejam totalmente confiáveis e reprodutíveis, houve a padronização do protocolo da PFGE para as bactérias que fazem parte do programa, denominado protocolo PulseNet (Swaminathan *et al.*, 2001).

### **Criação intensiva de bovinos (Embrapa, 2008)**

É chamado de "confinamento" o sistema de criação de bovinos em que lotes de animais são encerrados em piquetes ou currais com área restrita, e onde os alimentos e água necessários são fornecidos em cochos.

Este tipo de criação pode ser utilizado em qualquer etapa e/ou categoria de rebanho, contudo o confinamento é mais utilizado para a terminação de bovinos de corte, que é a fase da produção que imediatamente antecede o abate do animal, ou seja, envolve o acabamento da carcaça que será comercializada.

No Brasil, o gado proveniente de confinamento corresponde a uma pequena parte (cerca de 6%) do total do gado abatido, sendo o confinamento conduzido principalmente, durante a época seca do ano, ou seja, durante o período de entressafra da produção de carne, assim, os animais são comercializados no pico da entressafra quando então tendem a alcançar melhores preços.

Estudos realizados na Fazenda Lageado da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, buscaram obter animais com maior peso e em menor tempo através da implantação do projeto Novilho Superprecoce.

O novilho superprecoce é resultante da associação do potencial genético das linhagens ou dos produtos de cruzamento com a manipulação de fatores ambientais, notadamente a alimentação, para se conseguir a melhoria do desempenho animal. Imediatamente após o desmame os animais são encaminhados para regime de confinamento e abatidos antes dos 15 meses de idade, quando atingem

aproximadamente 450 kg, peso de abate, sem a utilização de qualquer tipo de promotor de crescimento.

A exemplo de outros sistemas de confinamento, a criação do novilho superprecoce pode favorecer a disseminação de bactérias patogênicas entre os animais do rebanho.

## 2. OBJETIVOS

### Gerais

Avaliar a ocorrência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) em isolados provenientes de diferentes fontes, ambientais ou não, da criação de bovinos confinados além das carcaças destes animais.

### Específicos

Avaliar a presença de genes de virulência (*stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *ehxA* e *eaeA*), identificar cepas de *E. coli* O157:H7 através da pesquisa do gene *uidA*; evidenciar a capacidade de produção de toxina de Shiga e de entero-hemolisina, identificar variantes de *stx* e de *eaeA* e determinar os sorotipos de linhagens de *Escherichia coli* provenientes de diferentes fontes, ambientais ou não, da criação de bovinos confinados, além de avaliar sua diversidade genética.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Todos os meios empregados foram da Oxoid (Basingstoke, Inglaterra), exceto quando informado.

##### 3.1.1 Isolados de *E. coli*

Os 628 isolados de *E. coli* avaliados neste estudo foram obtidos através de coletas, no período de março de 2002 a maio de 2003, de amostras de fezes, ambiente, água, ração e seus componentes realizadas no galpão de confinamento de novilhos da Fazenda Lageado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP - Botucatu, SP), estes isolados eram provenientes de outro estudo realizado naquela universidade.

As amostragens de animais compreenderam cinco raças distintas (Nelore, Simental, Angus, Angus ½ sangue e Simental ½ sangue). No frigorífico comercial onde os novilhos foram abatidos, foram coletadas amostras provenientes das carcaças dos animais, de utensílios (facas), de equipamentos (serra) e do ambiente de abate (piso e paredes da câmara frigorífica).

Das amostras de carcaça foram coletados três pontos, o posterior, o vazio e o anterior da parte externa e dois pontos da parte interna, abdômen e tórax. Tais coletas foram realizadas no dia do abate e no dia seguinte após a refrigeração das mesmas.

Os isolados de *E. coli* obtidos através das amostragens anteriormente citadas, foram conservados congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  em caldo triptona de soja (TSB) e 20% de glicerol estéril. Dos 628 isolados, 342 haviam sido previamente caracterizados como fermentadores de sorbitol (281 provenientes de amostras de fezes, 43 de carcaças de bovinos, 15 de ração e água e três de ambiente do criadouro e de abate) e 286 como incapazes de fermentar sorbitol (182 provenientes de fezes, 77 de carcaças de bovinos, 19 de ração e água e oito de ambiente do criadouro e de abate).

Para confirmar a pureza dos isolados, estes foram semeados em ágar Mac Conkey sorbitol e após o desenvolvimento bacteriano, três a cinco colônias típicas de *E. coli* foram selecionadas e avaliadas através de testes bioquímicos empregando-se os meios EPM, Mili e Citrato de Simmons (Probac, São Paulo, Brasil). Uma das colônias que se apresentou positiva para identificação de *E. coli*, foi repicada para TSB e TSA (ágar triptona de soja) e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h, sendo posteriormente congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  conforme já descrito.

### 3.1.2 Cepas padrão

As cepas padrão utilizadas como controle positivo e negativo para todos os ensaios realizados neste estudo, juntamente com suas características estão apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01 – Cepas padrão utilizadas como controle positivo e negativo nos ensaios deste estudo, suas características de interesse e procedência.

Cepa	Características	Procedência
<i>E. coli</i> K12	-	Instituto Adolfo Lutz
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL-933	<i>uidA</i> ; <i>stx</i> <sub>1</sub> ; <i>stx</i> <sub>2</sub> ; <i>eaeA</i>	Instituto Adolfo Lutz
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>uidA</i> ; <i>stx</i> <sub>1</sub> ; <i>stx</i> <sub>2</sub> ; <i>eaeA</i> ; <i>ehxA</i>	Instituto Butantan
<i>E. coli</i> α-hemolítica	produtora de α-hemólise	Instituto Adolfo Lutz
<i>Salmonella</i> ser. Braenderup H9812	padrão PFGE	Instituto Adolfo Lutz
<i>E. coli</i> 3560/96	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	Dr. Helge Karch
<i>E. coli</i> E32511/HSC	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	Dr. Helge Karch
<i>E. coli</i> EH250	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	Dr. Helge Karch
<i>E. coli</i> B2F1	<i>stx</i> <sub>2d</sub> (ativável)	Dr. Helge Karch
<i>E. coli</i> 2771/97	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	Dr. Helge Karch
<i>E. coli</i> T4/97	<i>stx</i> <sub>2f</sub>	Dr. Helge Karch
<i>E. coli</i> 4182	<i>eae</i> -α	Instituto Butantan
<i>E. coli</i> 487	<i>eae</i> -γ	Instituto Butantan
<i>E. coli</i> 2034	<i>eae</i> -δ/κ	Instituto Butantan
<i>E. coli</i> 580	<i>eae</i> -β	Instituto Butantan
<i>E. coli</i> 3977	<i>eae</i> -η	Instituto Butantan

## 3.2. Métodos

### 3.2.1 Avaliação da atividade hemolítica

Os isolados e as cepas controle foram semeados em TSB e incubados a 37°C *overnight*. A partir dessa cultura inoculou-se 3 µL em placas de ágar sangue base suplementado com 5% de sangue ovino lavado e 10 mM CaCl<sub>2</sub>, de acordo com Beutin *et al.* (1989).

As placas foram incubadas a 37°C e a atividade hemolítica foi observada após três e 24 h de incubação. Isolados com atividade hemolítica após 3 h de incubação foram considerados produtores de α-hemolisina e isolados com atividade hemolítica após 24 h foram considerados produtores de entero-hemolisina (Beutin *et al.*, 1989).

Para esta avaliação foram utilizadas como controle positivo as cepas *E. coli* O157:H7 e *E. coli*  $\alpha$ -hemolítica e como controle negativo a cepa *E. coli* K12 (Tabela 01).

### 3.2.2 Avaliação da presença dos genes *eaeA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *uidA* e *ehxA*

#### Preparo do DNA

Os isolados e as cepas padrão foram semeados em TSB e incubados a 37°C *overnight*. Alíquota de 1 mL foi submetida à centrifugação (11.000 g) em centrífuga 5417C (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o sedimento lavado por três vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril.

Após as lavagens, o sedimento foi ressuspenso em água Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA) estéril e submetido a aquecimento a 100°C por 10 min (AccuBlock – Digital Dry Bath, Labnet, Edison, EUA), imediatamente resfriado em gelo e mantido congelado a -20°C até o momento de ser utilizado.

#### Reação em cadeia da polimerase

Foram conduzidas duas reações independentes, uma *multiplex* para os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *uidA* e *eaeA* e outra somente para pesquisa do gene *ehxA*, ambas segundo metodologia descrita por Feng e Monday (2000). As duas PCR utilizaram respectivamente as cepas *E. coli* O157:H7 EDL-933 e *E. coli* O157:H7 (Instituto Butantan) como controles positivos e a cepa *E. coli* K12 como controle negativo (Tabela 01), além de um controle negativo para a reação, onde foi utilizada água Milli-Q estéril em substituição ao DNA teste. A seqüência dos *primers* utilizados para ambas as reações estão apresentados na Tabela 02.

Tanto a PCR *multiplex* como a PCR para *ehxA* foram realizadas empregando-se o kit PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) adicionando-se 300 nM de cada *primer* (IDT,

Coralville, EUA), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Ontário, Canadá) e 3 µL do DNA teste (preparado como descrito anteriormente) para um volume final de reação de 25 µL.

A amplificação foi realizada através de aquecimento inicial a 95°C por 3 min seguido de 25 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 56°C e 1 min a 72°C e uma extensão final por 7 min a 72°C em termociclador epMastercycler S (Eppendorf). Os produtos da PCR, se não submetidos imediatamente à eletroforese, foram armazenados a -20°C.

Tabela 02 – *Primers* utilizados para a detecção dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, *ehxA* e *uidA* por PCR segundo Feng e Monday (2000).

Gene	Seqüência	Tamanho do fragmento (pb)
<i>stx</i> <sub>1</sub>	F: cag tta atg tgg tgg cga agg	348
	R: cac cag aca atg taa ccg ctg	
<i>stx</i> <sub>2</sub>	F: atc cta ttc ccg gga gtt tac g	584
	R: gcg tca tcg tat aca cag gag c	
<i>eaeA</i>	F: att acc atc cac aca gac ggt	397
	R: aca gcg tgg ttg gat caa cct	
<i>ehxA</i>	F: gtt tat tct ggg gca ggc tc	158
	R: ctt cac gtc acc ata cat at	
<i>uidA</i>	F: gcg aaa act gtg gaa ttg gg	252
	R: tga tgc tcc atc act tcc tg	

F: Forward  
R: Reverse

### Visualização dos produtos da PCR

Aos produtos da amplificação foram adicionados 3 µL de *loading buffer* (Sambrook *et al.*, 1989), sendo os mesmos separados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X [0,9 M Tris base (Pharmacia, Buckinghamshire, EUA); 0,9 M ácido bórico (Pharmacia), 0,02 M EDTA (Pharmacia)], utilizando marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Gel XL Ultra V2 (Labnet) por 30 min a 100 V, contendo TBE 0,5X.

Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 µg. L<sup>-1</sup>) (Pharmacia), e a imagem foi registrada com o auxílio do sistema EDAS120 (Eastman Kodak, Nova Iorque, EUA), sob transiluminação UV 302 nm (Pharmacia LKB Macro Vue, Pharmacia).

As avaliações da atividade hemolítica e da presença dos genes *eaeA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *uidA* e *ehxA*, foram utilizadas como triagem para a pré-seleção de isolados de *E. coli*. A partir dos resultados obtidos nesses ensaios selecionou-se 66 cepas (Tabelas 03 e 04) que foram submetidas às avaliações seguintes. Sendo que, das 66 cepas, 40 são capazes de fermentar sorbitol (34 de amostras de fezes e seis de carcaça) e 26 são incapazes de fermentar sorbitol (16 de amostras de fezes, seis de água e quatro de carcaça).

Tabela 03 – Cepas de *E. coli* não fermentadoras de sorbitol pré-selecionadas para as avaliações seguintes, através dos resultados obtidos na pesquisa da atividade hemolítica e presença dos genes *eaeA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *uidA* e *ehxA*.

Identificação	Origem	Data da coleta	Identificação	Origem	Data da coleta
001 - <sup>1</sup>	Fezes AP <sup>2</sup>	15/07/02	138 -	Fezes AP176	17/02/03
005 -	Fezes SP <sup>3</sup>	15/07/02	142 -	Fezes AP176	17/02/03
008 -	Fezes AP176	22/08/02	151 -	Água B15 <sup>4</sup>	17/02/03
022 -	Fezes AP 155	25/09/02	153 -	Água B15	17/02/03
023 -	Fezes AP 161	25/09/02	169 -	Água B15	17/02/03
024 -	Fezes AP179	25/09/02	170 -	Água B15	17/02/03
040 -	Fezes AP 155	13/11/02	173 -	Água B15	17/02/03
041 -	Fezes AP176	13/11/02	174 -	Água B15	17/02/03
049 -	Fezes AP176	14/12/02	185 -	Fezes AP 206	10/03/03
063 -	Fezes AP176	14/12/02	194 -	Carcaça SP B621 I <sup>5</sup>	31/10/02
064 -	Fezes AP176	14/12/02	195 -	Carcaça SP B621 IR <sup>6</sup>	31/10/02
073 -	Fezes AP176	14/12/02	261 -	Carcaça N <sup>7</sup> 513 I	16/01/03
090 -	Fezes AP176	14/12/02	274 -	Carcaça N 852 E <sup>8</sup>	16/01/03

<sup>1</sup>Cepas Sorbitol Negativo; <sup>2</sup>Raça Angus Puro; <sup>3</sup>Raça Simental Puro; <sup>4</sup>Água do bebedor da Baía 15; <sup>5</sup>Carcaça Superfície Interna; <sup>6</sup>Carcaça Superfície Interna Refrigerada; <sup>7</sup>Raça Nelore; <sup>8</sup>Carcaça Superfície Externa

Tabela 04 – Cepas de *E. coli* fermentadoras de sorbitol pré-selecionadas para as avaliações seguintes, através dos resultados obtidos na pesquisa da atividade hemolítica e presença dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *uidA* e *ehxA*.

Identificação	Origem	Data da coleta	Identificação	Origem	Data da coleta
005 + <sup>1</sup>	Fezes A ½ <sup>2</sup> 3007	25/09/02	264 +	Fezes AP <sup>3</sup> 153	10/03/03
006 +	Fezes A ½ 3007	25/09/02	266 +	Fezes AP 155	10/03/03
032 +	Fezes AP 161	25/09/02	267 +	Fezes AP 161	10/03/03
079 +	Fezes AP 183	13/11/02	271 +	Fezes AP 158	10/03/03
089 +	Fezes S½ <sup>4</sup> 65	13/11/02	272 +	Fezes AP 152	10/03/03
092 +	Fezes S½ 67	13/11/02	274 +	Fezes AP 164	10/03/03
093 +	Fezes S½ 68	13/11/02	276 +	Fezes AP 177	10/03/03
119 +	Fezes AP s/n° 1	14/12/02	277 +	Fezes AP 178	10/03/03
128 +	Fezes AP s/n° 3	14/12/02	285 +	Carcaça S½ 68 ER <sup>5</sup>	18/11/02
131 +	Fezes AP s/n° 3	14/12/02	288 +	Carcaça S½ 72 I <sup>6</sup>	18/11/02
132 +	Fezes AP 158	14/12/02	299 +	Carcaça S½ 68 IR <sup>7</sup>	18/11/02
151 +	Fezes N <sup>8</sup> 630	14/12/02	302 +	Carcaça S½ 74 E <sup>9</sup>	18/11/02
153 +	Fezes N 630	14/12/02	303 +	Carcaça S½ 74 E	18/11/02
156 +	Fezes N 687	14/12/02	306 +	Carcaça S½ 74 E	18/11/02
170 +	Fezes A ½ 3001	14/01/03	347 +	Fezes S½ 75	25/09/02
172 +	Fezes A ½ 3002	14/01/03	348 +	Fezes S½ 76	25/09/02
186 +	Fezes A ½ 3012	14/01/03	369 +	Fezes SP <sup>10</sup> B41	25/09/02
189 +	Fezes A ½ 3017	14/01/03	376 +	Fezes SP 362	25/09/02
203 +	Fezes AP s/n° 1	17/02/03	378 +	Fezes SP Belo	25/09/02
204 +	Fezes AP s/n° 1	17/02/03	381 +	Fezes SP Boato	25/09/02

<sup>1</sup>Cepas Sorbitol Positivo; <sup>2</sup>Raça Angus ½ sangue; <sup>3</sup>Raça Angus Puro; <sup>4</sup>Raça Simental ½ Sangue; <sup>5</sup>Carcaça Superfície Externa Refrigerada; <sup>6</sup>Carcaça Superfície Interna; <sup>7</sup>Carcaça Superfície Interna Refrigerada; <sup>8</sup>Raça Nelore; <sup>9</sup>Carcaça Superfície Externa; <sup>10</sup>Raça Simental Puro

### 3.2.3 Avaliação da presença dos genes codificadores das variantes de toxina de Shiga

#### Preparo do DNA

A extração do DNA das cepa em estudo e das cepas padrão utilizadas para esta avaliação foi realizada conforme descrito no item 3.2.2.

#### Reação em cadeia da polimerase

Foram conduzidas reações independentes para cada um dos *primers* específicos para as variantes de Stx, segundo metodologia descrita por Zhang *et al.* (2002a), Friedrich *et al.* (2002), Piérard *et al.* (1998), Jelacic *et al.* (2003), Franke *et al.* (1995) e Schmidt *et al.* (2000).

As PCR utilizaram as cepas *E. coli* apresentadas na Tabela 01 como cepas controle específicas para as variantes de Stx e a cepa *E. coli* K12 como controle negativo. Como controle negativo para a reação, foi utilizada água Milli-Q estéril em substituição ao DNA teste. A seqüência dos *primers* utilizados está apresentada na Tabela 05.

Todas as PCR foram realizadas empregando-se o kit PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences) adicionando-se 300 nM de cada *primer* (IDT), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) e 3 µL do DNA teste para um volume final de reação de 25 µL.

Tabela 05 – Sequência dos *primers* utilizados para a detecção dos genes das variantes de Stx por PCR.

Gene	Sequência	Referência
<i>stx<sub>1c</sub></i>	F: ttt tca cat gtt acc ttt cct R: cat aga agg aaa ctc att agg	Zhang <i>et al.</i> , 2002a
<i>stx<sub>2B</sub>/stx<sub>2cB</sub></i>	F: atg aag aag atg ttt atg R: tca gtc att att aaa ctg	Friedrich <i>et al.</i> , 2002
<i>stx<sub>2d</sub></i>	F: aag aag ata ttt gta gcg g R: taa act gca ctt cag caa at	Piérard <i>et al.</i> , 1998
<i>stx<sub>2d</sub></i> (ativ.)	F: acc act ctg caa cgt ctc gc R: act gaa ttg tga cac aga tta	Jelacic <i>et al.</i> , 2003
<i>stx<sub>2e</sub></i>	F: ccc gga tcc atc aag tgt ata ttg tta R: ccc gaa ttc agc aca atc cgc cgc cat	Franke <i>et al.</i> , 1995
<i>stx<sub>2f</sub></i>	F: aga ttg ggc gtc att cac tgg ttg R: tac ttt aat ggc cgc cct gtc tcc	Schmidt <i>et al.</i> , 2000

F: Forward

R: Reverse

Independente do par de *primers* utilizado, todas as reações iniciaram-se com um aquecimento a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificação conforme apresentados na Tabela 06, e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR, quando não submetidos imediatamente à eletroforese, foram armazenados a -20°C.

Tabela 06 – Condições empregadas nos ciclos de amplificação da PCR para a avaliação da presença dos genes das variantes de Stx.

Gene	Ciclos de amplificação da PCR			Tamanho fragmento (pb)
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>stx<sub>1c</sub></i>	94°C, 30 s	51°C, 60 s	72°C, 60 s	498
<i>stx<sub>2B</sub>/stx<sub>2cB</sub></i>	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 40 s	260
<i>stx<sub>2d</sub></i>	94°C, 25 s	55°C, 50 s	72°C, 26 s	256
<i>stx<sub>2d</sub></i> (ativável)	95°C, 60 s	56°C, 60 s	72°C, 60 s	890
<i>stx<sub>2e</sub></i>	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 60 s	260
<i>stx<sub>2f</sub></i>	94°C, 30 s	57°C, 60 s	72°C, 60 s	428

### Visualização dos produtos da PCR

Aos produtos da amplificação foram adicionados 3  $\mu\text{L}$  de *loading buffer* (Sambrook *et al.*, 1989), sendo os mesmos separados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, utilizando marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal por 30 min a 100 V.

Após a eletroforese, o gel foi corado e a imagem foi registrada conforme anteriormente apresentado.

### Restrição do produto da PCR para o gene *stx<sub>2</sub>B/stx<sub>2c</sub>B* para diferenciar entre as variantes Stx2 e Stx2c

Os produtos de amplificação obtidos para *stx<sub>2</sub>B/stx<sub>2c</sub>B*, foram submetidos à restrição com as enzimas *HaeIII* e *FokI* (New England Biolabs), para diferenciar entre as subunidades B de Stx2 e Stx2c, segundo metodologia descrita por Rüssmann *et al.* (1994) com algumas modificações como segue.

As reações de restrição foram executadas separadamente, adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  do produto da PCR, 8 U da enzima *HaeIII* ou 200 U da enzima *FokI*, 1X do tampão 10X NEBuffer 2 para *HaeIII* ou tampão 10X NEBuffer 4 para *FokI*. O volume de reação foi completado para 50  $\mu\text{L}$  com água Milli-Q estéril.

Os tubos de reação foram incubados por 1 h a 37°C em termociclador epMastercycler S (Eppendorf) sendo então, adicionados 3  $\mu\text{L}$  de *loading buffer* (Sambrook *et al.*, 1989). O produto da restrição foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X, utilizando marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal por 30 min a 100 V.

Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Pharmacia), e a imagem foi registrada com o auxílio do sistema EDAS120, sob transiluminação UV 302 nm.

As amostras que apresentaram duas bandas de peso molecular aproximado de 123 pb e 137 pb, como produto da restrição com a enzima *HaeIII*, foram consideradas positivas para a presença do gene da subunidade B de Stx2c; já as

amostras que apresentaram duas bandas de peso molecular aproximado de 111 pb e 149 pb como produto da restrição com a enzima *FokI*, foram consideradas positivas para a presença do gene da subunidade B de Stx2.

### **3.2.4 Sorotipificação**

As 66 cepas foram repicadas em TSA e encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP), onde a Dra. Kinue Irino procedeu a sorotipificação, segundo metodologia descrita por Edwards (1986) e Scheutz *et al.* (2004).

Para a determinação dos antígenos somáticos (antígenos O1 ao O181) e dos antígenos flagelares (H1 ao H56) foram utilizados anti-soros preparados na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, utilizando cepas de referência de *E. coli* recebidas do Centro Internacional de Referência (World Health Organization - WHO) (Scheutz *et al.*, 2004).

### **3.2.5 Avaliação da presença dos genes codificadores das variantes de intimina**

#### **Preparo do DNA**

A extração do DNA das cepa em estudo e das cepas padrão utilizadas para esta avaliação foi realizada conforme descrito no item 3.2.2.

## Reação em cadeia da polimerase

Foram submetidas a avaliação por PCR das variantes de intimina as 21 cepas que apresentaram na primeira PCR (item 3.2.2) resultado positivo para a presença do gene *eaeA*.

As reações foram conduzidas de forma independente para cada um dos *primers* específicos para as variantes de intimina, segundo metodologia descrita por Schmidt *et al.* (1993), Oswald *et al.* (2000) e Zhang *et al.* (2002b).

As PCR utilizaram as cepas de *E. coli* descritas na Tabela 01 como cepas controle específicas para as variantes de intimina e a cepa *E. coli* K12 como controle negativo, além de um controle negativo para a reação, onde foi utilizada água Milli-Q estéril em substituição ao DNA teste.

O *primer* SK1 foi utilizado como *forward* para todas as reações em combinação com os *primers* LP2, LP3, LP4, LP5, LP6B, LP7, LP8, LP10 e LP11B. As seqüências dos mesmos estão apresentadas na Tabela 07.

Todas as PCR foram realizadas empregando-se 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas), 0,4  $\mu$ M de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 1 x High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen), 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Invitrogen) e 3  $\mu$ L do DNA teste preparado conforme item 3.2.2, para um volume final de reação de 25  $\mu$ L.

Independente do par de *primers* utilizado, todas as reações iniciaram-se com um aquecimento a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de amplificação conforme apresentados na Tabela 08, e extensão final a 72°C por 5 min. Para o *primer* LP3, os ciclos de amplificação apresentaram duas temperaturas diferentes de anelamento, três ciclos foram executados na temperatura mais baixa seguidos de 28 ciclos em temperatura mais elevada (Tabela 08). Os produtos da PCR, quando não submetidos imediatamente à eletroforese, foram armazenados a -20°C.

Tabela 07 – Seqüência dos *primers* utilizados para a detecção dos genes das variantes de intimina, *eae- $\alpha$* , *eae- $\gamma$* , *eae- $\beta$* , *eae- $\epsilon$* , *eae- $\zeta$* , *eae- $\iota$* , *eae- $\eta$* , *eae- $\kappa$*  e *eae- $\theta$*  por PCR.

Gene	Primer	Seqüência	Referência
	SK1 <sup>F</sup>	ccc gaa ttc ggc aca agc ata agc	Schmidt <i>et al.</i> , 1994
<i>eae-<math>\alpha</math></i>	LP2	ccc gaa ttc tta ttt tac aca agt ggc	Schmidt <i>et al.</i> , 1993
<i>eae-<math>\gamma</math></i>	LP3	ccc gaa ttc tta ttc tac aca aac cgc	
<i>eae-<math>\beta</math></i>	LP4	ccc gtg ata cca gta cca att acg gtc	Oswald <i>et al.</i> , 2000
<i>eae-<math>\epsilon</math></i>	LP5	agc tca ctc gta gat gac ggc aag cg	
<i>eae-<math>\zeta</math></i>	LP6B	tag ttg tac tcc cct tat cc	Zhang <i>et al.</i> , 2002b
<i>eae-<math>\iota</math></i>	LP7	ttt atc ctg ctc cgt ttg ct	
<i>eae-<math>\eta</math></i>	LP8	tag atg acg gta agc gac	
<i>eae-<math>\kappa</math></i>	LP10	ggc att gtt atc tgt tgt ct	
<i>eae-<math>\theta</math></i>	LP11B	gtt gat aac tcc tga tat ttt a	

<sup>F</sup> primer usado como *foward* em combinação com os demais

Tabela 08 – Condições empregadas nos ciclos de amplificação da PCR para a avaliação da presença dos genes das variantes de intimina.

Primer	Ciclos de amplificação da PCR			Tamanho fragmento (pb)
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
LP2	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 120 s	2807
LP3	94°C, 30 s	48°C, 60 s	72°C, 90 s <sup>1</sup>	2792
	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 90 s <sup>2</sup>	
LP4	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 120 s	2287
LP5	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 120 s	2608
LP6B	94°C, 30 s	53°C, 60 s	72°C, 150 s	2430
LP7	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 150 s	2685
LP8	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 150 s	2590
LP10	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 150 s	2769
LP11B	94°C, 30 s	50°C, 60 s	72°C, 150 s	2686

<sup>1</sup> três ciclos de amplificação; <sup>2</sup> 28 ciclos de amplificação

## **Visualização dos produtos da PCR**

Aos produtos da amplificação foram adicionados 3  $\mu$ L de *loading buffer* (Sambrook *et al.*, 1989), sendo os mesmos separados em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X, utilizando marcador de peso molecular de 1 kb (New England Biolabs). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal por 30 min a 100 V.

Após a eletroforese, o gel foi corado e a imagem foi registrada conforme anteriormente apresentado.

### **3.2.6 Avaliação da atividade citotóxica**

#### **3.2.6.1 Citotoxicidade em células Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977)**

As cepas foram avaliadas quanto à produção de Stx através do teste de citotoxicidade em células Vero, conforme preconizado por Konowalchuk *et al.* (1977) e descrito a seguir.

#### **Preparo do sobrenadante das culturas de *E. coli***

As cepas deste estudo e as cepas controle (*E. coli* K12 - controle negativo e *E. coli* O157:H7 EDL-933 - controle positivo) foram semeadas em tubos contendo 3 mL de caldo TSB e incubadas por 18 h a 37°C, sob agitação constante de 150 rpm em Shaker Innova 4000 (New Brunswick Scientific, Edison, EUA). Após esse período, 2 mL da cultura foram transferidos para tubos tipo Falcon (50 mL) estéreis e centrifugados por 10 min a 10.000 g (Mikro 22R – Hettich Zentrifugen, Tuttingen, Alemanha).

Os sobrenadantes obtidos foram então filtrados em membranas esterilizantes (Millipore) de 0,22  $\mu$ m de porosidade e mantidos congelados a -20°C até a realização do teste.

### Teste em células Vero

Microplacas de 96 poços contendo cultura de células Vero em uma concentração aproximada de 150.000 células/ poço foram obtidas na Seção de Cultura Celulares do Instituto Adolfo Lutz e levadas imediatamente ao laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), para execução do teste.

O meio presente nas placas [meio 199 adicionado de 1 mM de aminoácidos não essenciais e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil)] foi vertido e substituído por 80 µL do mesmo meio preparado no momento do uso. Em seguida foram adicionados 20 µL dos sobrenadantes das cepas a serem testadas e das cepas padrão, todos em triplicata.

As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) por 24 – 48 h, e a leitura realizada em microscópio invertido (Nikon, Tóquio, Japão), através da observação da lise celular, com leituras em 24 e 48 h de incubação. As amostras que produzem Stx, ou outra toxina capaz de atuar neste tipo de célula, destróem a monocamada de células Vero dos poços.

#### 3.2.6.2 Citotoxicidade em células Vero (Karmali *et al.*, 1985)

As cepas que não demonstraram citotoxicidade segundo a metodologia descrita no item 3.2.6.1, mas que haviam apresentado *eaeA* e/ou *stx* foram submetidas ao teste descrito a seguir.

#### Preparo do sobrenadante das culturas de *E. coli* sem sulfato de polimixina B

As cepas em estudo e as cepas controle (*E. coli* K12 - controle negativo e *E. coli* O157:H7 EDL-933 - controle positivo) foram semeadas em tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 5 mL de caldo Penassay (Anexo B) e incubadas por 18 h a 37°C, sob

agitação constante de 150 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 10 min a 10.000 g.

Os sobrenadantes obtidos foram então filtrados em membranas esterilizantes (Millipore) de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade e mantidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio.

### **Preparo do sobrenadante das culturas de *E. coli* com sulfato de polimixina B**

As cepas em estudo e as cepas controle (*E. coli* K12 - controle negativo e *E. coli* O157:H7 EDL-933 - controle positivo) foram semeadas em tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 5 mL de caldo Penassay (Anexo B) e incubadas por 5 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante de 150 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 10 min a 10.000 g, lavada com solução salina tampão fosfato, pH 7,3 (PBS – Anexo C), ressuspensa em 1 mL de solução de sulfato de polimixina B (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) ( $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) e novamente incubada por 30 min nas mesmas condições anteriores.

Transcorrido o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 10.000 g e então, os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membranas esterilizantes (Millipore) com poro de  $0,22 \mu\text{m}$  e mantidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio.

### **Teste em células Vero**

O ensaio em cultura de células Vero foi realizado da forma descrita anteriormente (item 3.2.6.1).

### **3.2.7 Avaliação da produção de toxina da Shiga por ensaio imunocromatográfico**

O teste Duopath Verotoxin® (DV - Merck) foi executado conforme recomendações do fabricante e descrito brevemente a seguir. As cepas a serem testadas foram repicadas para 1 mL de caldo CAYE (Anexo A) (Merck) já adicionado de suplemento específico (CAYE Broth Supplement) (Merck) e incubadas por 6 h a 37°C. Transcorrido o período de incubação, 180 µL do cultivo foram transferidos para Eppendorfs e adicionados de 20 µL de solução de sulfato de polimixina B (Calbiochem) (5 mg.mL<sup>-1</sup>) e novamente incubados por 10 min a 37°C.

Em seguida, os tubos foram agitados e 150 µL da suspensão foram transferidos para o orifício de teste do Duopath Verotoxin®. Transcorrido de 10 a 20 min em temperatura ambiente, foi feita a leitura dos resultados.

### **3.2.8 Avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR para detecção de genes para Stx e do teste imunocromatográfico (Duopath®)**

Para avaliar a eficiência dos ensaios PCR para detecção dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> e imunocromatográfico para detecção e identificação de Stx, calculou-se as taxas de sensibilidade e especificidade, conforme preconizado por Feldsine *et al.* (2002), considerando como metodologia de referência a avaliação da citotoxicidade em células Vero.

Segundo Feldsine *et al.* (2002), a sensibilidade é a razão entre o número de amostras positivas pela metodologia teste e confirmadas pela metodologia de referência (verdadeiro positivo) e o número total de amostras verdadeiramente positivas. Especificidade é a razão entre o número de amostras negativas pelo método empregado e pela metodologia referência (verdadeiro negativo) e o número total de amostras verdadeiramente negativas.

### 3.2.9 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A PFGE foi executada conforme protocolo para *Escherichia coli* O157:H7 preconizado pelo PulseNet, CDC (Center for Disease Control and Prevention, EUA).

#### Suspensão celular

As cepas em estudo e a cepa de *Salmonella* ser. Braenderup, utilizada como marcador de peso molecular no protocolo PulseNet segundo Hunter *et al.* (2005), foram inoculadas, por esgotamento, em placa contendo TSA e incubadas por 24 h a 37°C. Após a incubação, verificou-se a pureza das culturas e repicou-se por espalhamento uma colônia isolada para nova placa de TSA, para a obtenção de crescimento em massa. Estas placas foram incubadas por 14-18 h a 37°C.

Todo o crescimento foi removido com o auxílio de alça de níquel-cromo e transferido para tubos de ensaio contendo 3 mL de tampão de suspensão celular (CSB) [100 mM Tris-HCl (Pharmacia); 10 mM EDTA pH 8,0]. Determinou-se a absorbância dessa suspensão a 610 nm (Ultrospec 2000 – Pharmacia) e a densidade óptica foi corrigida para 1,3 – 1,4 para dessa forma obter uma suspensão celular suficiente à restrição.

A partir da suspensão com a densidade óptica corrigida, uma alíquota de 400 µL foi transferida para tubos Eppendorf, onde foram adicionados 20 µL de proteinase K (20 mg.mL<sup>-1</sup>) (Sigma, Nova Iorque, EUA) agitando gentilmente.

#### Preparo dos blocos de agarose

Aos tubos com a suspensão celular e proteinase K foram adicionados 400 µL de solução de agarose [Seakem Gold Agarose (Cambrex, Nova Jersey, EUA)] 1% em solução de dodecil sulfato de sódio [SDS (USB, Ohio, EUA)] 1% em TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) previamente preparada. Após a homogeneização, aproximadamente 300 µL da mistura foram distribuídos nos moldes (BioRad,

Califórnia, EUA) e mantidos à temperatura ambiente para a formação dos blocos de agarose.

### **Lise celular e lavagens**

Após a solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 5 mL de solução de lise [50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8,0; 1% Sarcosina (Sigma); 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de Proteinase K] e foram incubados por 2 h a 54°C sob agitação de 150 rpm em incubadora com agitação. Os blocos foram submetidos a duas lavagens de 10 min cada, com água Milli-Q estéril pré-aquecida a 50°C e quatro lavagens de 15 min cada, com tampão TE estéril também pré-aquecido a 50°C. Os blocos de agarose foram armazenados em tubos Eppendorf com 1 mL de tampão TE, sob refrigeração, até a execução da restrição.

### **Restrição**

Porções dos blocos (aproximadamente 2,0-2,5 mm) foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min em tampão 1 X NE 2 (New England Biolabs, Ipswich, EUA). O tampão foi retirado e acrescentou-se 200 µL da solução de restrição [1X NE 2; 10 U. µL<sup>-1</sup> XbaI (New England Biolabs)]. Os tubos foram gentilmente agitados e incubados a 37°C por 2 h.

### **Eletroforese**

Os produtos da digestão enzimática foram separados através de eletroforese em gel de agarose (1% Seakem Gold Agarose) em tampão TBE 0,5 X empregando-se o aparelho Gene Navigator System (Pharmacia) com os seguintes parâmetros: tempo de corrida = 20 h, 200 V, ângulo = 120°, gradiente = 6 v.cm<sup>-1</sup>, temperatura do

tampão = 12°C, tempo inicial = 2,16 seg e tempo final = 63,8 seg. Após a eletroforese, o gel foi corado por 30 min em solução aquosa de brometo de etídio ( $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ) e examinado sob transiluminação UV 302 nm, sendo a imagem registrada com o auxílio do sistema EDAS120.

### **Análise dos resultados**

Os padrões de bandas gerados foram comparados visualmente e agrupados em perfis. A correlação entre os perfis obtidos foi avaliada com o auxílio do programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) utilizando-se o coeficiente de Dice (Dice, 1945) e análise de *clusters* UPGMA (Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average) (Sneath e Sokal, 1973) para gerar o dendrograma, com valor de tolerância de 1%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cepas STEC O157:H7 que não fermentam sorbitol são importantes patógenos humanos em todo o mundo (Mead e Griffin, 1998) e essa característica é empregada como indicativa da presença desse patógeno na avaliação de colônias suspeitas isoladas a partir de alimentos. Entretanto, desde 1988, cepas O157:H- que apresentam a capacidade de fermentar sorbitol, têm sido associadas com SHU (Rosser *et al.*, 2008). Por essa razão, foram avaliadas neste estudo tanto cepas fermentadoras de sorbitol como aquelas que não apresentam a capacidade de fermentar esse carboidrato.

### 4.1 Avaliação da atividade hemolítica

Do total de 628 isolados avaliados, 85,5% (537) não apresentaram qualquer atividade hemolítica, enquanto 12,1% (76) apresentaram-se produtores de  $\alpha$ -hemolisina e 2,4% (15) foram produtores de entero-hemolisina.

Dentre os 76 isolados produtores de  $\alpha$ -hemolisina, 38 (50%) eram incapazes de fermentar sorbitol, enquanto os demais eram fermentadores de sorbitol. Já dentre os 15 isolados produtores de entero-hemolisina 13 (86,7%) não eram fermentadores de sorbitol e somente dois (13,3%) fermentadores de sorbitol.

Dos 15 isolados produtores de entero-hemolisina, 11 (73,3%) foram provenientes de amostras de fezes de bovinos e quatro (26,7%) de amostras de carcaças de bovinos (Tabela 09).

#### 4.2 Avaliação da presença dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *uidA* e *ehxA*

Os 628 isolados foram avaliados para a presença dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *uidA* e *ehxA*, sendo que 563 (89,6%) não apresentaram os genes pesquisados, enquanto os 65 (10,4%) restantes apresentaram pelo menos um dos genes avaliados neste estudo.

Das cepas que apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados, 22 (33,8%) cepas apresentaram apenas o gene *stx<sub>1</sub>*, 12 (18,5%) apresentaram o gene *eaeA*, sete (10,8%) continham o gene *stx<sub>2</sub>* e seis (9,2%) foram positivas para a presença de *ehxA*. As demais cepas apresentaram combinações de dois ou mais genes: duas (3,1%) cepas apresentaram os genes *ehxA* e *stx<sub>2</sub>*, outras duas cepas (3,1%) foram positivas para os genes *ehxA* e *stx<sub>1</sub>*, três (4,6%) apresentaram ambos os genes para toxina Stx, duas (3,1%) continham os genes *ehxA*, *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>*, uma (1,5%) cepa foi positiva para os genes *ehxA*, *stx<sub>1</sub>*, *eaeA* e *stx<sub>2</sub>* e oito (12,3%) apresentaram os genes *ehxA*, *uidA*, *eaeA* e *stx<sub>2</sub>* (Tabela 09).

Tabela 09 – Presença dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *uidA* e *ehxA*, produção de enterohemolisina e origem das cepas de *E. coli*.

Genes / Eh*	Origem (nº de cepas)
<i>stx<sub>1</sub></i>	Fezes (16); carcaças (6)
<i>stx<sub>2</sub></i>	Fezes (7)
<i>eaeA</i>	Fezes (6); água (6)
<i>ehxA</i> / Eh	Carcaça (1)
<i>ehxA</i>	Fezes (5)
<i>ehxA</i> ; <i>stx<sub>2</sub></i> / Eh	Carcaça (2)
<i>ehxA</i> ; <i>stx<sub>1</sub></i>	Fezes (2)
<i>stx<sub>1</sub></i> ; <i>stx<sub>2</sub></i>	Fezes (3)
<i>ehxA</i> ; <i>stx<sub>1</sub></i> ; <i>stx<sub>2</sub></i> / Eh	Fezes (2)
<i>ehxA</i> ; <i>uidA</i> ; <i>eaeA</i> ; <i>stx<sub>2</sub></i> / Eh	Fezes (7); Carcaça (1)
<i>ehxA</i> ; <i>stx<sub>1</sub></i> ; <i>eaeA</i> ; <i>stx<sub>2</sub></i> / Eh	Fezes (1)
Ausência/Eh	Fezes (1)

\* produção de entero-hemolisina

Os resultados característicos encontrados para a PCR multiplex dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* e *uidA* e para PCR do gene *ehxA*, podem ser observados nas Figuras 02 e 03 respectivamente.

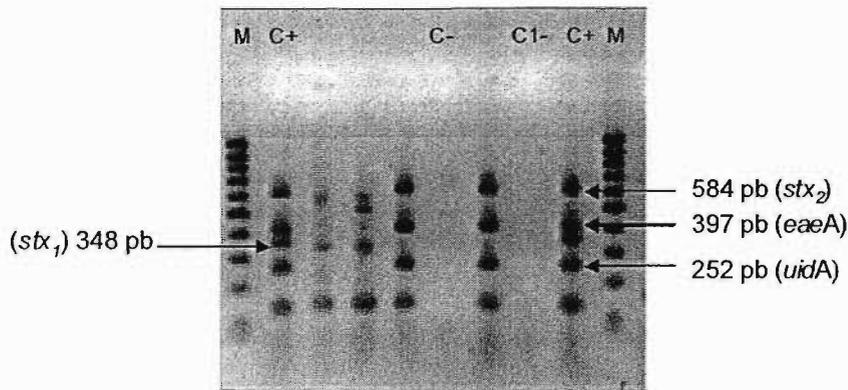


Figura 02 – Detecção dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* e *uidA*, por PCR segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

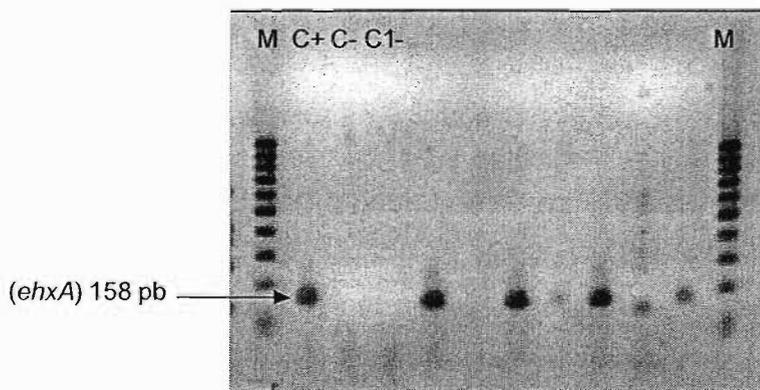


Figura 03 – Detecção do gene *ehxA*, por PCR segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: *E. coli* O157:H7; C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

A avaliação da atividade hemolítica e da presença dos genes *eaeA*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *uidA* e *ehxA* foi utilizada, nessa pesquisa, como triagem de isolados de *E. coli* possivelmente patogênicos, portanto as cepas (66) que apresentaram resultados positivos nesses ensaios (Tabela 09) foram selecionadas e submetidas às avaliações seguintes. Destas 66 cepas, 65 apresentaram pelo menos um dos genes

pesquisados e atividade entero-hemolítica, enquanto apenas uma cepa apresentou-se positiva apenas para a produção de entero-hemolisina sem qualquer um dos genes avaliados.

Embora a maioria dos isolados não tenha apresentado os genes pesquisados, a detecção, principalmente dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> salienta a existência de cepas potencialmente patogênicas. Tais cepas encontradas nas amostras de fezes demonstram ser esta uma fonte possível de contaminação do ambiente de criação, de abate e das carcaças. Já as cepas potencialmente patogênicas provenientes de amostras de carcaças indicam o potencial risco à saúde pública, uma vez que podem chegar viáveis ao produto final e assim aos consumidores.

Entretanto, apesar de a detecção da presença de genes de virulência ser uma boa indicação do potencial patogênico de microrganismos, deve-se ter cautela com a interpretação dos dados obtidos, pois a presença do gene não é garantia de que o mesmo seja expresso ou mesmo que seu produto seja ativo. Ainda assim, Ritchie *et al.* (2003) afirmam que o estudo dos fatores de patogenicidade na determinação da virulência de STEC é mais importante que a identificação dos sorogrupos, pois a variedade de sorogrupos relacionados com isolados clínicos é muito ampla.

#### 4.3 Avaliação da presença dos genes das variantes de toxina de Shiga

Através desta avaliação procurou-se detectar a presença dos genes para as variantes de Stx1 (*stx*<sub>1c</sub>) e Stx2 (*stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2datv</sub>, *stx*<sub>2e</sub> e *stx*<sub>2f</sub>) nas cepas de *E. coli*.

Foram submetidas à avaliação as 66 cepas de *E. coli*, sendo que em 26 delas foi possível identificar um ou mais genes para as variantes de *stx* (Tabela 10). Todos os genes para as variantes de *stx* avaliados foram identificados.

Três cepas (151-, 153- e 169-) nas quais não havia sido detectada a presença de *stx* (Tabela 10), quando submetidas a este ensaio apresentaram a variante *stx*<sub>2e</sub>, indicação de que o par de *primers* utilizado na triagem dos isolados pode não ser eficiente para identificar essa variante. Segundo Ramotar *et al.* (1995), nem todos os pares de *primers* desenhados para detectar *stx*<sub>2</sub> são capazes de detectar as variantes desse gene. Alguns estudos relatam que *primers* específicos para a variante *stx*<sub>2e</sub> devem ser utilizados (Johnson *et al.*, 1990; Franke *et al.*, 1995).

Na Tabela 10 estão relacionadas as cepas (26) que mostraram-se positivas para a presença de gene para as variantes de Stx.

Os resultados típicos encontrados para a PCR das variantes  $stx_{1c}$ ,  $stx_{2c}$ ,  $stx_{2d}$ ,  $stx_{2datv}$ ,  $stx_{2e}$  e  $stx_{2f}$ , podem ser observados nas Figuras 04 e 05.

Tabela 10 – Variantes dos genes  $stx_1$  e  $stx_2$  identificadas em cepas de *E. coli*.

Identificação	Origem	$stx_1$	$stx_2$	Variantes de $stx$	
				$stx_1$	$stx_2$
001 - <sup>1</sup>	Fezes	-	+	-	$stx_{2dat}$
005 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2dat}$
008 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2dat}$
022 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2c}$ ; $stx_{2dat}$
023 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2dat}$
024 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2dat}$
040 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2c}$ ; $stx_{2dat}$
041 -	Fezes	-	+	-	$stx_{2c}$ ; $stx_{2dat}$
049 -	Fezes	+	-	$stx_{1c}$	-
063 -	Fezes	+	-	$stx_{1c}$	-
064 -	Fezes	+	-	$stx_{1c}$	-
073 -	Fezes	+	+	$stx_{1c}$	$stx_{2c}$ ; $stx_{2dat}$
151 -	Água	-	-	-	$stx_{2e}$
153 -	Água	-	-	-	$stx_{2e}$
169 -	Água	-	-	-	$stx_{2e}$
185 -	Fezes	+	+	$stx_{1c}$	$stx_{2d}$ ; $stx_{2dab}$ ; $stx_{2f}$
194 -	Carcaça	-	+	-	$stx_{2d}$ ; $stx_{2dat}$
195 -	Carcaça	-	+	-	$stx_{2c}$ ; $stx_{2dat}$
274 -	Carcaça	-	+	-	$stx_{2d}$ ; $stx_{2dat}$
005 + <sup>2</sup>	Fezes	+	-	$stx_{1c}$	-
006 +	Fezes	+	-	$stx_{1c}$	-
128 +	Fezes	-	+	-	$stx_{2c}$
151 +	Fezes	-	+	-	$stx_{2f}$
153 +	Fezes	-	+	-	$stx_{2f}$
274 +	Fezes	+	+	$stx_{1c}$	$stx_{2d}$ ; $stx_{2dab}$ ; $stx_{2f}$
376 +	Fezes	+	-	$stx_{1c}$	-

<sup>1</sup>Cepas Sorbitol Negativo; <sup>2</sup>Cepas Sorbitol Positivo

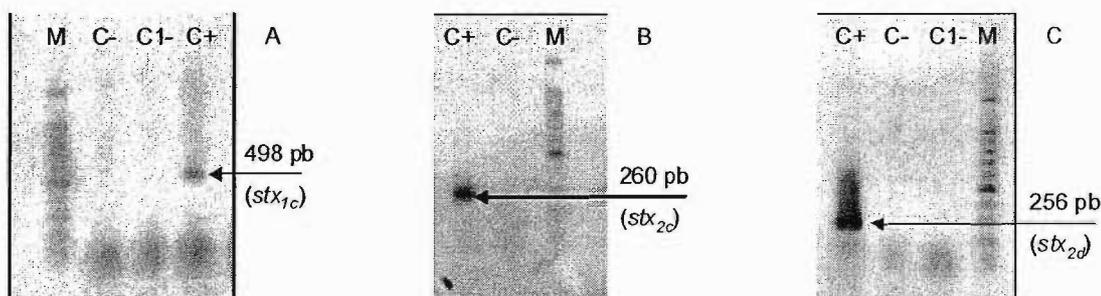


Figura 04 – Detecção dos genes *stx*<sub>1c</sub> (A), *stx*<sub>2c</sub> (B) e *stx*<sub>2d</sub> (C), por PCR segundo Zhang *et al.* (2002a), Friedrich *et al.* (2002) e Piérard *et al.* (1998), respectivamente. M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: cepa controle positivo (Tabela 01); C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

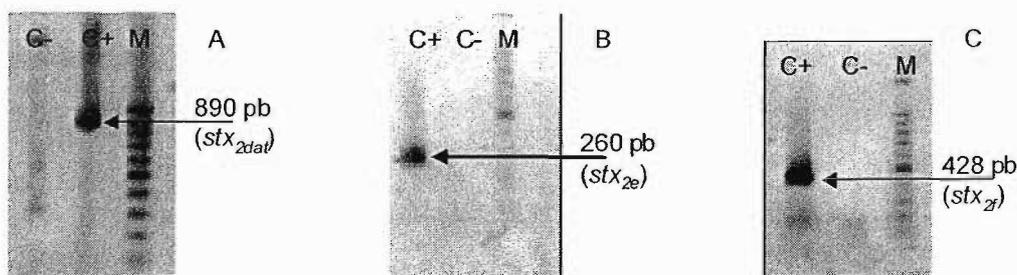


Figura 05 – Detecção dos genes *stx*<sub>2datv</sub> (A), *stx*<sub>2e</sub> (B) e *stx*<sub>2f</sub> (C), por PCR segundo Jelacic *et al.* (2003), Franke *et al.* (1995) e Schmidt *et al.*, 2000, respectivamente. M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: cepa controle positivo (Tabela 01); C-: *E. coli* K12.

A variante mais freqüentemente encontrada dentre as cepas de *E. coli* foi *stx*<sub>2datv</sub>, detectada em 14 cepas, seguida pelas variantes *stx*<sub>1c</sub> (nove cepas), *stx*<sub>2c</sub> (seis), *stx*<sub>2d</sub> (quatro), *stx*<sub>2f</sub> (quatro) e *stx*<sub>2e</sub> (três).

Dentre as 26 cepas, a maioria (65,4%) apresentou apenas um dos genes para as variantes de *stx* pesquisados. Seis cepas (23,5%) apresentaram o gene *stx*<sub>1c</sub>, cinco (19,2%) foram positivas para o gene *stx*<sub>2datv</sub>, três (11,5%) para o gene *stx*<sub>2e</sub>, duas cepas positivas para *stx*<sub>2f</sub> e uma (3,8%) apresentou o gene *stx*<sub>2c</sub>. O gene *stx*<sub>2d</sub> foi o único que não foi detectado isoladamente, apenas em combinações com outros.

Enquanto as demais nove cepas (34,6%) apresentaram combinações de dois ou mais genes, assim distribuídos: quatro cepas (15,4%) foram positivas para os genes *stx*<sub>2c</sub> e *stx*<sub>2datv</sub>, duas (7,7%) apresentaram os genes *stx*<sub>2d</sub> e *stx*<sub>2datv</sub>, outras

duas (7,7%) positivas para *stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2datv</sub> e *stx*<sub>2f</sub> e uma cepa (3,8%) foi positiva para os genes *stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2c</sub> e *stx*<sub>2datv</sub>.

Neste estudo, evidenciou-se nove cepas STEC que carregam o gene *stx*<sub>1c</sub>, sendo que em três (33,3%) delas houve detecção de uma ou mais variantes de *stx*<sub>2</sub>. Destas três, apenas uma apresentou também o gene *eaeA*. Estes resultados sugerem, segundo Zhang *et al.* (2002a), que as cepas que carregam apenas o gene *stx*<sub>1c</sub> teriam menos importância em termos de saúde pública, do que as demais cepas STEC.

Salientamos que 15 cepas (três provenientes de amostras de carcaças e 12 de amostras de fezes) foram positivas para os genes *stx*<sub>2c</sub> e/ou *stx*<sub>2datv</sub> isoladamente ou em combinação com outras variantes de *stx*, uma vez que tais variantes são as mais frequentemente encontradas em cepas isoladas de pacientes com SHU e CH (Beutin *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2007). As demais variantes são encontradas em isolados de diarreia branda (Caprioli *et al.*, 2005) ou humanos assintomáticos (Beutin *et al.*, 2007).

Um total de 626 cepas STEC obtidas de pacientes com SHU, pacientes apenas com diarreia e pacientes assintomáticos da Alemanha, foi analisado por Friedrich *et al.* (2002) para as variantes de Stx2. Foram detectados os genes *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub> e *stx*<sub>2e</sub>, entretanto a maioria das cepas (57,3%) não apresentou genes para as variantes *stx*. Especificamente *stx*<sub>2c</sub> foi a única variante de Stx2 associada à isolados de SHU, enquanto *stx*<sub>2d</sub> e *stx*<sub>2e</sub> foram encontradas em 20,2% das 262 STEC provenientes de pacientes apenas com diarreia.

Sonntag *et al.* (2005) pesquisaram na Alemanha a presença da variante *stx*<sub>2e</sub> em amostras de fezes de pacientes e encontraram que de um total de 747 STEC, apenas 13 (1,7%) apresentaram a variante pesquisada. As cepas *stx*<sub>2e</sub>-positivas foram isoladas exclusivamente de pacientes com diarreia branda ou assintomáticos.

A detecção de mais de um gene para as variantes de *stx* também foi observada no estudo realizado na Austrália por Brett *et al.* (2003a). Eles subtiparam o gene *stx*<sub>2</sub> de 127 cepas STEC provenientes de amostras de bovinos, e verificaram que 25,2% destas cepas apresentaram mais de uma variante de *stx*<sub>2</sub>.

Entretanto, outras pesquisas apresentam combinações diferentes, das encontradas neste estudo, para os genes das variantes de *stx*. Cergole-Novella *et al.* (2006), em São Paulo, avaliaram cepas STEC isoladas de amostras clínicas, de

bovinos e de alimentos e evidenciaram que os genótipos  $stx_{2c}/stx_{2d}$  e  $stx_1/stx_2/stx_{2c}$  ocorreram exclusivamente em amostras bovinas.

Diferentes combinações de genótipos  $stx$  também podem ser observadas em isolados provenientes de amostras clínicas, mas em menor frequência do que em isolados de animais. Zhang *et al.* (2002a) caracterizaram as variantes de Stx em 214 cepas STEC proveniente de amostras clínicas (pacientes com SHU, diarreia e assintomático) da Alemanha. Dentre o total de cepas, os genótipos encontrados foram:  $stx_1$  (49,1%);  $stx_{1c}$  (5,6%);  $stx_1 + stx_2$  (23%);  $stx_{1c} + stx_2$  (0,5%);  $stx_1 + stx_{2c}$  (6,5%);  $stx_1 + stx_2 + stx_{2c}$  (1,9%);  $stx_1 + stx_{2d}$  (1,9%) e  $stx_{1c} + stx_{2d}$  (11,7%). Os autores relatam que somente uma cepa que apresentou a variante  $stx_{1c}$  foi proveniente de paciente com SHU, porém esta mesma cepa apresentou também  $stx_2$ . Segundo eles, a variante  $stx_{1c}$  parece estar associada ou com casos mais brandos de doença ou com infecções assintomáticas. Todas as cepas  $stx_{1c}$  positivas não apresentaram o gene *eaeA*, indicando mais uma razão para o predomínio em infecções assintomáticas e brandas.

A frequência dos genes para as variantes de  $stx$  encontrada neste estudo difere do relato de Brett *et al.* (2003b). Os autores pesquisaram a presença de  $stx_{1c}$  entre cepas STEC proveniente de amostras de bovinos, ovinos e humanos. Dentre as cepas proveniente de ovinos, 65,7% apresentaram-se positivas para  $stx_{1c}$ , das cepas de origem bovina somente 5,8% apresentaram o gene e 26,6% das cepas clínicas foram positivas para o gene.

Na avaliação realizada por Vu-Khac e Cornick (2008), dentre as cepas STEC proveniente de amostras bovinas, os genes para as variantes de  $stx$  detectados foram:  $stx_1$  (24,1%),  $stx_{1c}$  (55,2%),  $stx_2$  (34,5%),  $stx_{2c}$  (6,9%),  $stx_{2d}$  (24,1%),  $sxt_{2dativ}$  (9,4%) e  $stx_{2g}$  (10,3%). Para as cepas isoladas de bubalinos e caprinos também houve predomínio do gene  $stx_{1c}$ , 65,6% e 61,2%, respectivamente.

Em Montana (EUA), Jelacic *et al.* (2003) analisaram cepas STEC provenientes de pacientes quanto às variantes de  $stx_2$ . Eles encontraram 78,2% das cepas positivas apenas para  $stx_2$ , 3,6% foram positivas para  $stx_{2c}$ , outras 3,6% positivas para  $stx_{2datv}$ , 3,6% para  $stx_{2c}$  e  $stx_{2datv}$  e 7,3% para os genes  $stx_2$  e  $stx_{2c}$ .

Segundo Friedrich *et al.* (2002), a maioria das cepas STEC que produz Stx2 ou Stx2c apresenta também o gene *eaeA*, fato este que também pode ser observado nos resultados deste estudo. Das 15 cepas positivas para *stx*<sub>2</sub> ou *stx*<sub>2c</sub>, nove (60%) apresentaram o gene que codifica a intimina.

Os resultados anteriormente apresentados (presença dos genes *eaeA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *uidA* e *ehxA* e dos genes para as variantes de *stx*) permitiram diferenciar dentre as 66 cepas selecionadas, 50 (8,0%) como STEC (Tabela 11), ou seja, cepas que apresentaram o gene para produção de Stx (*stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> e/ou variantes de *stx*) com ou sem a presença do gene para intimina (*eaeA*). Outras nove (1,4%) cepas foram consideradas como EPEC atípicas por apresentarem somente o gene para intimina (Tabela 12). Enquanto, as demais cepas (7) foram caracterizadas apenas como entero-hemolíticas.

Tabela 11 – Características das cepas identificadas como STEC.

Identificação	Origem	Eh <sup>1</sup>	Presença dos genes (PCR)					Variantes de <i>stx</i>	
			<i>ehxA</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>uidA</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>
001 - <sup>2</sup>	Fezes AP <sup>3</sup>	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2dat</sub>
005 -	Fezes SP <sup>4</sup>	-	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>2dat</sub>
008 -	Fezes AP176	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2dat</sub>
022 -	Fezes AP 155	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2c</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
023 -	Fezes AP 161	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2dat</sub>
024 -	Fezes AP179	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2dat</sub>
040 -	Fezes AP 155	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2c</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
041 -	Fezes AP176	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2c</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
049 -	Fezes AP176	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	-
063 -	Fezes AP176	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	-
064 -	Fezes AP176	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	-
073 -	Fezes AP176	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	<i>stx</i> <sub>2c</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
090 -	Fezes AP176	-	-	-	-	+	-	-	-
151 -	Água B15 <sup>5</sup>	-	-	+	-	-	-	-	<i>stx</i> <sub>2e</sub>
153 -	Água B15	-	-	+	-	-	-	-	<i>stx</i> <sub>2e</sub>
169 -	Água B15	-	-	+	-	-	-	-	<i>stx</i> <sub>2e</sub>
185 -	Fezes AP 206	+	+	+	+	+	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	<i>stx</i> <sub>2d</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub> <i>stx</i> <sub>2f</sub>

Cont.

Cont. Tabela 11

194 -	Carcaça SP B621 I <sup>6</sup>	+	+	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>2di</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
195 -	Carcaça SP B621 IR <sup>7</sup>	+	+	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>2ci</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
274 -	Carcaça N <sup>8</sup> 852 E <sup>9</sup>	+	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>2di</sub> ; <i>stx</i> <sub>2dat</sub>
005 + <sup>10</sup>	Fezes A ½ <sup>11</sup> 3007	-	+	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	-
006 +	Fezes A ½ 3007	-	+	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	-
032 +	Fezes AP 161	-	-	-	+	-	-	-	-
079 +	Fezes AP 183	-	-	-	+	-	-	-	-
089 +	Fezes S½ <sup>12</sup> 65	-	-	-	+	-	-	-	-
092 +	Fezes S½ 67	-	-	-	+	-	-	-	-
093 +	Fezes S½ 68	-	-	-	+	-	-	-	-
119 +	Fezes AP s/n° 1	-	-	-	-	+	-	-	-
128 +	Fezes AP s/n° 3	-	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>2c</sub>
151 +	Fezes N 630	-	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>2f</sub>
153 +	Fezes N 630	-	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>2f</sub>
170 +	Fezes A ½ 3001	-	-	-	+	-	-	-	-
186 +	Fezes A ½ 3012	-	-	-	+	-	-	-	-
189 +	Fezes A ½ 3017	-	-	-	+	-	-	-	-
264 +	Fezes AP 153	-	-	-	+	-	-	-	-
267 +	Fezes AP 161	-	-	-	+	-	-	-	-
271 +	Fezes AP 158	-	-	-	-	+	-	-	-
272 +	Fezes AP 152	-	-	-	+	+	-	-	-
274 +	Fezes AP 164	+	+	-	+	+	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	<i>stx</i> <sub>2d</sub> <i>stx</i> <sub>2dat</sub> <i>stx</i> <sub>2f</sub>
276 +	Fezes AP 177	-	-	-	+	+	-	-	-
277 +	Fezes AP 178	-	-	-	+	+	-	-	-
285 +	Carcaça S½ 68 ER <sup>13</sup>	-	-	-	+	-	-	-	-
288 +	Carcaça S½ 72 I	-	-	-	+	-	-	-	-
299 +	Carcaça S½ 68 IR	-	-	-	+	-	-	-	-
302 +	Carcaça S½ 74 E	-	-	-	+	-	-	-	-
303 +	Carcaça S½ 74 E	-	-	-	+	-	-	-	-
306 +	Carcaça S½ 74 E	-	-	-	+	-	-	-	-
347 +	Fezes S½ 75	-	-	-	+	-	-	-	-
348 +	Fezes S½ 76	-	-	-	+	-	-	-	-
376 +	Fezes SP 362	-	-	-	+	-	-	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	-

<sup>1</sup>Atividade Entero-hemolítica; <sup>2</sup>Cepas Sorbitol Negativo; <sup>3</sup>Raça Angus Puro; <sup>4</sup>Raça Simental Puro; <sup>5</sup>Água da Baía 15; <sup>6</sup>Carcaça Superfície Interna; <sup>7</sup>Carcaça Superfície Interna Refrigerada; <sup>8</sup>Raça Nelore; <sup>9</sup>Carcaça Superfície Externa; <sup>10</sup>Cepas Sorbitol Positivo; <sup>11</sup>Raça Angus ½ Sangue; <sup>12</sup>Raça Simental ½ Sangue; <sup>13</sup>Carcaça Superfície Externa Refrigerada

Tabela 12 – Características das cepas identificadas como EPEC atípicas.

Identificação	Origem	Eh <sup>1</sup>	Presença dos genes (PCR)					Variantes de <i>stx</i>	
			<i>ehxA</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>uidA</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>
138 - <sup>2</sup>	Fezes AP <sup>3</sup> 176	-	-	+	-	-	-	-	-
142 -	Fezes AP176	-	-	+	-	-	-	-	-
170 -	Água B15 <sup>4</sup>	-	-	+	-	-	-	-	-
173 -	Água B15	-	-	+	-	-	-	-	-
174 -	Água B15	-	-	+	-	-	-	-	-
172 + <sup>5</sup>	Fezes A ½ <sup>6</sup> 3002	-	-	+	-	-	-	-	-
203 +	Fezes AP s/n° 1	-	-	+	-	-	-	-	-
204 +	Fezes AP s/n° 1	-	-	+	-	-	-	-	-
266 +	Fezes AP 155	-	-	+	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Atividade Entero-hemolítica; <sup>2</sup>Cepas Sorbitol Negativo; <sup>3</sup>Raça Angus Puro; <sup>4</sup>Água da Baía 15; <sup>5</sup>Cepas Sorbitol Positivo; <sup>6</sup>Raça Angus ½ Sangue

A maioria (30/50 – 60%) das cepas caracterizadas como STEC foi fermentadora de sorbitol, fato que enfatiza a importância da pesquisa de cepas patogênicas tanto dentre isolados fermentadores como não fermentadores.

Das 50 cepas STEC, 38 (76%) foram provenientes de amostras de fezes, enquanto nove (18%) foram de amostras de carcaças e três (6%) cepas foram provenientes de amostras de água da baía de confinamento. Nenhuma amostra de ração ou de ambiente foi positiva para STEC.

Considerando apenas os isolados provenientes de amostras de fezes (38/463) o percentual de STEC foi de 8,2%, enquanto para os isolados de amostras de carcaças (9/120) a ocorrência de STEC típicas foi de 7,5% e para os isolados de amostras de água (3/20) foi de 15%.

Dentre as cepas STEC, 18 (36%) apresentaram o gene *stx*<sub>1</sub>, quatro (8%) continham os genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>1c</sub>, três cepas (6%) foram positivas para cada uma das combinações: *ehxA*, *eaeA*, *stx*<sub>2</sub>, *uidA*, *stx*<sub>2dat</sub> e *eae-γ*; *ehxA*, *eaeA*, *stx*<sub>2</sub>, *uidA*, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2dat</sub> e *eae-γ*; *eaeA* e *stx*<sub>2e</sub>; *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>. Outras três cepas (6%) apresentaram apenas o gene *stx*<sub>2</sub>, duas (4%) continham os genes *ehxA*, *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>1c</sub>, outras duas (4%) foram positivas para os genes *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>2f</sub>. Para as demais combinações: *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>2dat</sub>; *ehxA*, *eaeA*, *stx*<sub>2</sub>, *uidA* e *stx*<sub>2dat</sub>; *ehxA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2c</sub> e *stx*<sub>2dat</sub>; *ehxA*, *eaeA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2dat</sub>, *stx*<sub>2f</sub> e *eae-β*; *ehxA*, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2d</sub> e *stx*<sub>2dat</sub>; *ehxA*, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub> e *stx*<sub>2dat</sub>; *ehxA*, *eaeA*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2dat</sub> e *eae-γ*; *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>2c</sub>; *ehxA*, *eaeA*,

*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2dat</sub> e *stx*<sub>2f</sub>, foram identificadas uma cepa (2%) em cada uma delas.

Avaliando apenas os genes responsáveis pela produção de Stx, os resultados mostram um maior percentual de cepas STEC positivas para *stx*<sub>1</sub> e/ou suas variantes (24/50 - 48%) enquanto o percentual de cepas positivas para *stx*<sub>2</sub> e/ou suas variantes foi de 38% (19/50) e o percentual de cepas positivas para a presença de ambos os genes para *stx* e/ou suas variantes foi de 14% (7/50). Tais resultados estão de acordo com o relatado por outros pesquisadores que mostraram que cepas STEC provenientes de amostras de fezes de bovinos de corte e de leite no Brasil tendem a possuir apenas *stx*<sub>1</sub> ou *stx*<sub>1</sub> combinado com *stx*<sub>2</sub> (Cerqueira *et al.*, 1999; Leomil *et al.*, 2003; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007).

Cerqueira *et al.* (1999) isolaram cepas STEC de amostras de fezes de bovinos de leite e de corte no Estado do Rio de Janeiro e encontraram, de maneira geral, uma maior ocorrência daquelas carreadoras dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> (58%). Entretanto, quando se avalia somente os resultados obtidos para as cepas provenientes das amostras de gado de corte, observa-se o predomínio do genótipo *stx*<sub>1</sub> (45%).

Em uma pesquisa realizada no Estado de São Paulo, Leomil *et al.* (2003) avaliaram 24 cepas STEC provenientes de amostras de fezes de bovinos com diarreia e de bovinos saudáveis e, através de PCR, identificaram a presença de *stx*<sub>1</sub> em 50% das cepas, de ambos os genes em 33,3% e do gene *stx*<sub>2</sub> em 16,7%. Eles observaram ainda que a ocorrência de cepas positivas para *stx* foi maior dentre os isolados de animais doentes.

Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) isolaram, em São Paulo, 24 (8,5%) cepas STEC de amostras de fezes de novilhos saudáveis e destas, 46% possuíam o gene *stx*<sub>1</sub>, 13% o gene *stx*<sub>2</sub> e 42% ambos.

O predomínio do genótipo *stx*<sub>1</sub> também é relatado em outros países. Midgley *et al.* (1999) avaliaram a dinâmica de STEC em bovinos de corte durante a criação por confinamento na Austrália, encontrando 7,4% das amostras positivas para o grupo. Das 26 STEC isoladas, 53,8% foram sorotipificadas como O136:H16, sendo todas positivas para o gene *stx*<sub>1</sub> e *ehxA*, e isoladas em diferentes dias da avaliação. As demais cepas apresentaram diferentes combinações dos genes avaliados. Os pesquisadores verificaram ainda, de maneira semelhante à este estudo, que STEC não foi isolada das amostras do ambiente de confinamento.

Blanco *et al.* (2005) avaliaram na Suíça 330 amostras de fezes bovinas e encontraram 132 cepas de *E. coli* positivas para o gene *eaeA*. Destas cepas, 21 foram caracterizadas como STEC. Dentre as cepas STEC, 61,9% apresentaram o gene *stx*<sub>1</sub>, 19% o gene *stx*<sub>2</sub> e também 19% ambos os genes *stx*, enquanto 85,7% apresentaram o gene *ehxA*.

Alguns trabalhos relatam a ocorrência de cepas de *E. coli stx*<sub>1</sub>-positivas entre outras espécies animais. Vettoratto *et al.* (2003), no Estado de São Paulo, avaliaram a frequência de STEC em fezes de ovinos saudáveis. Eles observaram que 50% das cepas apresentaram o gene *stx*<sub>1</sub> combinado com *stx*<sub>2</sub>; apenas *stx*<sub>1</sub> foi encontrado em 38,9% das cepas, enquanto 11,9% das cepas apresentaram apenas o gene *stx*<sub>2</sub>. Todas as cepas STEC foram negativas para a presença do gene *eaeA* e 33,3% foram positivas para gene *ehxA*.

Blanco *et al.* (2003), na Espanha, caracterizaram cepas STEC provenientes de amostras de fezes de ovinos e de um total de 384 isolados verificaram que, 55% apresentaram o gene *stx*<sub>1</sub>; 3% o gene *stx*<sub>2</sub> e 43% ambos os genes para a produção de Stx. Os genes *ehxA* e *eaeA* foram encontrados em 28% e 6% dos isolados, respectivamente.

Outros pesquisadores relatam resultados semelhantes aos nossos, porém com isolados clínicos. Vaz *et al.* (2004) em um trabalho retrospectivo no Estado de São Paulo, analisaram 2607 isolados clínicos de *E. coli*, obtidos entre os anos de 1976 e 1999 de pacientes com diarreia. Dentre estes, 29 foram identificados como STEC e a grande maioria (93%) apresentou apenas o gene *stx*<sub>1</sub>.

Alguns estudos sugerem que a ocorrência de *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> pode variar de acordo com a espécie animal analisada e a localização geográfica. Por exemplo, no oeste da Espanha, todas as cepas provenientes de ovinos, apresentaram o gene *stx*<sub>2</sub>, enquanto as cepas provenientes de caprinos carregavam *stx*<sub>1</sub> e *ehxA* (Rey *et al.*, 2006). Resultados de um estudo conduzido na Índia demonstram que *stx*<sub>1</sub> foi o único gene encontrado em cepas STEC de amostras de carne bovina, enquanto as cepas provenientes de frutos do mar possuíam *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> (Kumar *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, Barkocy-Gallagher *et al.* (2004) reportaram a alta ocorrência de *stx*<sub>2</sub> ou de ambos (*stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>) entre cepas STEC O157 e não-O157 de amostras bovinas. Já no Brasil, a presença de *stx*<sub>2</sub> predominou em isolados de carne (Bergamini *et al.*, 2007; Rodolpho e Marin, 2007), enquanto *stx*<sub>1</sub> prevaleceu entre amostras de origem humana (Vaz *et al.*, 2004; Cergole-Novella *et al.*, 2006).

Resultados divergentes dos encontrados neste estudo, onde a frequência de *stx*<sub>2</sub> ou de ambos os genes foi maior que de *stx*<sub>1</sub> também são relatados. Irino *et al.* (2005) caracterizaram cepas STEC isoladas de gado leiteiro do Estado de São Paulo e identificaram que 97% das cepas apresentaram o gene *stx*<sub>2</sub> ou ambos (*stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>) e apenas 3% foram positivas para somente o gene *stx*<sub>1</sub>.

Vicente *et al.* (2005) analisaram, no Estado de São Paulo, amostras de fezes de gado leiteiro e encontraram uma frequência de 31,5% de cepas positivas para seqüência do gene *stx*<sub>2</sub>; 24% para ambos os genes *stx* e apenas 4,4% das cepas positivas para o gene *stx*<sub>1</sub>.

No Rio Grande do Sul, Timm *et al.* (2007) isolaram 34 cepas STEC de amostras de fezes bovinas. Onze (32,3%) destas cepas apresentaram os genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>, 16 (47%) apenas o gene *stx*<sub>2</sub>, enquanto sete (20,6%) continham somente o gene *stx*<sub>1</sub>.

Farah *et al.* (2007), no Paraná, caracterizaram 64 cepas STEC entre amostras de fezes de bovinos, e observaram que 54,7% destas foram positivas para o gene *stx*<sub>2</sub>, 3,1% para o gene *stx*<sub>1</sub> e 42,2% para ambos.

Em Minas Gerais, Oliveira *et al.* (2008) avaliaram STEC isoladas de fezes de bovinos de corte e encontraram maior ocorrência (54,4%) de cepas positivas para ambos os genes, enquanto 30% e 15,6% foram positivas para *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>1</sub>, respectivamente.

Mesmo avaliando bezerros com diarreia em São Paulo, Rigobelo *et al.* (2006a) encontraram uma baixa frequência de STEC, quando comparada com outros estudos. Do total de 173 isolados estudados, apenas nove (5,2%) foram caracterizados como STEC pela presença dos genes para produção de Stx. Destes, 44,4% continham apenas *stx*<sub>1</sub>, outros 44,4% apenas *stx*<sub>2</sub> e 11,1% apresentaram ambos os genes para Stx.

Parma *et al.* (2000), na Argentina, isolaram de amostras de bovinos saudáveis, com diarreia e bovinos já no abatedouro, 59 cepas STEC sendo que a frequência dos genes para Stx encontrada foi de 57,6%, 25,4% e 16,9% para cepas que apresentaram apenas *stx*<sub>2</sub>, apenas *stx*<sub>1</sub> e ambos os genes, respectivamente.

Na Espanha, Orden *et al.* (2002) isolaram 70 cepas STEC de amostras de fezes de bovinos, sendo 60% positivas para o gene *stx*<sub>2</sub>, 22,8% para *stx*<sub>1</sub> e 17,1% para ambos.

Blanco *et al.* (2004b), na Argentina, avaliaram a presença de genes de virulência em 131 cepas STEC isoladas de fezes de bovinos criados em confinamento (62 cepas) e em pastagens (69). Destas cepas, 20 (15,3%) (15 isolados de bovinos criados em pastagens e cinco isolados de bovinos de confinamento) possuíam o gene *stx*<sub>1</sub>, 93 (71%) o gene *stx*<sub>2</sub> (42 de pastagens, 51 de confinamento) e 13 (10%) (11 de pastagens e duas de confinamento) ambos.

Em um outro trabalho também realizado na Argentina, Meichtri *et al.* (2004) avaliaram um total de 86 cepas STEC provenientes de amostras de fezes de novilhos, sendo que dessas, 68 (79,1%) apresentaram o gene *stx*<sub>2</sub>, 12 (14%) ambos os genes para produção de Stx e apenas seis (7%) o gene *stx*<sub>1</sub>.

Fegan *et al.* (2004) pesquisaram a ocorrência de *E. coli* O157 em amostras de fezes de bovinos confinados e criados em pastagens na Austrália. Eles observaram que todas as cepas apresentaram pelo menos um dos genes para Stx, 56% das cepas apresentaram *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>, 38% apenas *stx*<sub>2</sub> e 5% *stx*<sub>1</sub>. Dentre as cepas provenientes de gado confinado, 65% apresentaram ambos os genes para a toxina e nenhuma das cepas foi positiva apenas para a presença do gene *stx*<sub>1</sub>.

Padola *et al.* (2004) encontraram na Argentina 44 cepas STEC entre os isolados provenientes de bovinos criados por confinamento. Destas, 88,6% apresentaram-se positivas para o gene *stx*<sub>2</sub> enquanto apenas 11,4% o eram para o gene *stx*<sub>1</sub>.

Na Espanha, Blanco *et al.* (2004a) caracterizaram 514 cepas STEC provenientes de bovinos saudáveis ou com diarreia e demonstraram que 20% das cepas apresentaram o gene *stx*<sub>1</sub>, 54% o gene *stx*<sub>2</sub> e 26% ambos. Os genes para entero-hemolisina e intimina foram detectados em 63% e 29% respectivamente.

Em outro trabalho também realizado na Espanha, das 514 cepas STEC de bovinos, Mora *et al.* (2005) encontraram 15,9% (82) pertencentes ao sorotipo O157:H7. Dentre essas cepas, 2,4% foram positivas para o gene *stx*<sub>1</sub>, 56,1% para o gene *stx*<sub>2</sub> e 41,5% para ambos. Já entre as cepas não-O157, 22,9% foram positivas para o gene *stx*<sub>1</sub>, 53,7% para o gene *stx*<sub>2</sub> e 23,4% para ambos.

Na Suíça, Zweifel *et al.* (2005) caracterizaram 42 cepas STEC isoladas de amostras de fezes de bovinos de corte, 18 (43%) possuíam o gene *stx*<sub>1</sub>, 20 (48%) o gene *stx*<sub>2</sub> e quatro (9%) ambos os genes.

Bastos *et al.* (2006) caracterizaram cepas STEC O157 provenientes de amostras de alimentos, de bovinos e de casos clínicos da Argentina, Brasil, Chile,

Colômbia, Uruguai e Estados Unidos. Do total de 38 cepas avaliadas, 97,4% apresentaram o gene *stx<sub>2</sub>* sozinho ou combinado com alguma variante de *stx<sub>2</sub>* ou com *stx<sub>1</sub>*. Dos 14 isolados de origem bovina, 64,3% apresentaram somente *stx<sub>2c</sub>*.

Em Istambul, Yilmaz *et al.* (2006) testaram por PCR isolados de *E. coli* O157 e O157:H7 provenientes de fezes, carcaça e ambiente de abate de bovinos, para os genes *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>*. Das 27 cepas O157:H7, cinco foram positivas para ambos os genes, 19 para *stx<sub>2</sub>*, enquanto *stx<sub>1</sub>* isoladamente não foi detectado nas cepas testadas.

A ocorrência de STEC encontrada por Perelle *et al.* (2007), na França, foi de 17,4% em amostras de carne e leite bovinos coletados em diferentes localizações geográficas daquele país durante um período de 12 meses. Eles verificaram que 19% das amostras apresentaram apenas o gene *stx<sub>1</sub>*, 51,3% o gene *stx<sub>2</sub>* e 29,7% ambos.

Dentre as 50 cepas deste estudo caracterizadas como STEC, pode-se observar que 12 cepas (24%) (oito proveniente de amostras de fezes, três de amostras de água e uma de amostra de carcaça) apresentam os genes que caracterizam uma EHEC, ou seja, *eaeA* e algum ou ambos os genes para Stx e/ou os genes das variantes de *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>*. Destas 12 cepas, oito (66,7%) apresentaram o gene *stx<sub>2</sub>* e foram também positivas para a presença o gene *uidA*, específico para o sorotipo O157:H7, três cepas (25%) foram positivas para o gene *stx<sub>2e</sub>* e a outra cepa foi positiva para ambos os genes que codificam Stx, além do *eaeA*, entretanto as últimas quatro cepas não apresentaram *uidA* (Tabela 11).

Alguns estudos sugerem que o gene *eaeA* é pouco freqüente entre cepas STEC isoladas de bovinos (Blanco *et al.*, 1997; Guth *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2004b). Porém, de maneira geral, os resultados são bastante variáveis.

No Brasil, Irino *et al.* (2005) pesquisaram a presença de STEC em amostras de fezes de bovinos de leite e encontraram aproximadamente 1% das cepas positivas para a presença do gene *eaeA*.

Também no Brasil, Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) verificaram dentre as STEC isoladas de fezes de novilhos, que 25% possuíam o gene *eaeA*.

Meichtri *et al.* (2004) na Argentina, encontraram o gene responsável pela produção de intimina em 7% das cepas STEC isoladas de fezes de bovinos.

Nas pesquisas com amostras proveniente de ovinos conduzidas por Blanco *et al.* (2003) e Vettoratto *et al.* (2003), os autores relataram, respectivamente, 6% e 0% das STEC positivas para o gene *eaeA*.

Vu-Khac e Cornick (2008), no Vietnã, estudaram a ocorrência de STEC entre bubalinos, bovinos e caprinos. Eles identificaram o microrganismo em 27% dos isolados proveniente dos búfalos, em 23% dos isolados de bovinos e em 39% dos isolados de caprinos, porém o gene *eaeA* foi encontrado em apenas 7,5% dos isolados provenientes de caprinos.

Observando os resultados por nós obtidos e os dados encontrados na literatura, pode-se afirmar que a pesquisa do gene *eaeA* não pode ser utilizada como única ferramenta para pesquisa de cepas STEC.

Com relação a presença do gene *ehxA* entre as cepas STEC deste estudo, 15 (30%) do total de 50 cepas apresentaram-se positivas para esse gene.

Com resultados semelhantes, Meichtri *et al.* (2004) na Argentina, encontraram o gene responsável pela produção de entero-hemolisina em 29 cepas STEC (33,7%) isoladas de fezes de bovinos.

O mesmo ocorreu nas pesquisas de Blanco *et al.* (2003) e Vettoratto *et al.* (2003) com amostras proveniente de ovinos. Os autores relataram respectivamente, 28% e 33,3% das STEC positivas para o gene *ehxA*.

Já no estudo de Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) no Brasil, o percentual de cepas positivas para o gene *ehxA* foi maior que o evidenciado por nós. Os pesquisadores constataram que dentre as STEC isoladas de fezes de novilhos, 58% possuíam o gene.

Comparando-se os resultados obtidos para a produção de entero-hemolisina e a presença do gene *ehxA*, responsável pela produção da mesma, observa-se que enquanto todas as cepas não fermentadoras de sorbitol que apresentaram *ehxA* o expressam (Tabela 11), sete cepas fermentadoras de sorbitol (005+, 006+, 131+, 132+, 156+, 378+ e 381+) (Tabela 11) apresentaram o gene *ehxA*, mas não o expressaram. Por outro lado, uma cepa (369+) mostrou-se produtora de entero-hemolisina, porém o gene *ehxA* não foi detectado. Para esta cepa a atividade hemolítica verificada deve ser decorrente de outra hemolisina capaz de lisar as hemáceas e que deve ser produzida na mesma fase de desenvolvimento bacteriano que a entero-hemolisina (Beutin, 1991).

A avaliação da produção de entero-hemolisina é considerada como uma ferramenta fenotípica para uma pré-seleção de isolados de *E. coli* possivelmente patogênicos por ser de fácil interpretação, rápida e econômica, principalmente quando se trabalha com um grande número de isolados. Embora ainda não se saiba se esta hemolisina está ou não envolvida na patogenicidade de *E. coli*, sabe-se que existe uma forte relação entre a sua produção e cepas de STEC, sejam elas do sorogrupo O157 ou não (Nataro e Kaper, 1998). Entretanto, esta relação não foi comprovada neste estudo, uma vez que do total de cepas STEC (50), apenas 13 (26%) apresentaram produção de entero-hemolisina.

A avaliação realizada por Salvadori *et al.* (2003), no Mato Grosso do Sul, com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de bezerros com diarreia, apresentou resultados semelhantes aos nossos. Os pesquisadores detectaram que do total de 205 isolados avaliados, 9,8% foram produtores de  $\alpha$ -hemolisina, enquanto nós observamos 12,1% do total de 628 isolados. Já dentre as cepas STEC, os autores relatam que 35,5% foram produtoras de entero-hemolisina.

Contudo, nossos resultados diferem dos encontrados por Beutin *et al.* (1989) que estudaram a produção de entero-hemolisina por 64 cepas STEC de diversas origens e encontraram associação entre entero-hemolisina e produção de Stx em 89% das cepas.

#### 4.4 Sorotipificação

Das 66 cepas encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz foi possível a identificação de ambos os antígenos, O e H, em 31 (47%) cepas. Cinco cepas (7,6%) foram identificadas como imóveis e sorotipificadas como O177:H- (duas cepas – 3%); O172:H-; O178:H- e ONT:H- (uma cepa em cada sorotipo – 1,5%).

Para 27 cepas (40,9%) não foi possível tipificar o antígeno somático (O) com os anti-soros atualmente disponíveis (O1 ao O181), enquanto três cepas (4,5%) foram identificadas como rugosas (R).

Os resultados da sorotipificação das cepas STEC e EPEC atípicas podem ser visualizados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. Das 50 cepas caracterizadas como STEC, 29 (58%) tiveram os sorotipos identificados e foram assim classificadas

O157:H7 (sete cepas – 24,1%); O97:H1 (quatro cepas – 13,8%); O38:H21 e O87:H25 (três cepas em cada sorotipo – 10,3%); O79:H14; O136:H16 e O85:H7 (duas cepas em cada sorotipo – 6,9%); O102:H21 e O152:H16 (uma cepa em cada sorotipo – 3,4%). Destas 29 cepas, quatro foram identificadas como imóveis: O172:H-, O177:H- (duas cepas) e O178:H-.

As demais 21 (42%) cepas de STEC tiveram o antígeno O e/ou o antígeno H não tipificável (NT) ou eram rugosas (R) (Tabela 13).

Segundo Feng *et al.* (1998), isolados identificados como rugosos (OR) podem apresentar fatores de patogenicidade e características semelhantes a cepas do sorogrupo O157. Os pesquisadores caracterizaram uma cepa STEC de amostra de carne da Malásia e identificaram que a cepa possuía fenótipo e fatores de patogenicidade iguais a de uma O157:H7, mas através da sorotipificação essa cepa foi identificada como OR.

Em nossos resultados, duas cepas foram identificadas como OR (OR:H30 e OR:H7), e apresentaram genes para produção de Stx. Estes resultados ressaltam a importância da identificação dos fatores de patogenicidade para a caracterização de isolados de *E. coli* enteropatogênicos, uma vez que através apenas da sorotipificação essa caracterização nem sempre é possível.

Tabela 13 – Sorotipos/ sorogrupos e origem das 50 cepas de *E. coli* caracterizadas como STEC.

Sorotipo/sorogrupo	Origem (nº de cepas)	Sorotipo/sorogrupo	Origem (nº de cepas)
O157:H7	Fezes (6); carcaça (1)	ONT <sup>1</sup> :H8	Fezes (3)
O97:H1	Fezes (1); água (3)	ONT:HNT <sup>2</sup>	Fezes (1)
O85:H7	Fezes (2)	ONT:H21	Carcaça (1); fezes (1)
O38:H21	Fezes (3)	ONT:H7	Fezes (5)
O87:H25	Carcaça (3)	ONT:H34	Fezes (1); carcaça (1)
O79:H14	Fezes (2)	ONT:H2	Fezes (1)
O136:H16	Fezes (2)	ONT:H10	Fezes (2)
O152:H16	Carcaça (1)	ONT:H16	Fezes (1)
O102:H21	Fezes (1)	ONT:H31	Fezes (1)
O177:H- <sup>3</sup>	Carcaça (2)	ONT:H46	Fezes (1)
O172:H-	Fezes (1)	OR <sup>4</sup> :H7	Fezes (1)
O178:H-	Fezes (1)	OR:H30	Fezes (1)

<sup>1</sup>Antígeno O identificado como não tipificável com os anti-soros atualmente disponíveis; <sup>2</sup>Antígeno H identificado como não tipificável com os anti-soros atualmente disponíveis; <sup>3</sup>Cepa identificada como imóvel; <sup>4</sup>Cepa identificada como rugosa

Tabela 14 – Sorotipos/ sorogrupos e origem das 12 cepas de *E. coli* caracterizadas como EPEC atípicas.

Sorotipo/sorogrupo	Origem (nº de cepas)
O97:H1	Água (5)
O85:H7	Fezes (2)
ONT <sup>1</sup> :H8	Fezes (3)
ONT:HNT <sup>2</sup>	Água (1)
ONT:H2	Fezes (1)

<sup>1</sup>Antígeno O identificado como não tipificável com os anti-soros atualmente disponíveis;

<sup>2</sup>Antígeno H identificado como não tipificável com os anti-soros atualmente disponíveis

Há uma grande variedade de sorotipos entre isolados de *E. coli* proveniente de bovinos, já tendo sido identificados mais de 400 sorotipos STEC neste tipo de amostra (Blanco *et al.*, 2004a). A elevada frequência de cepas STEC não tipificáveis como encontrada neste estudo (42%) foi também relatada por outros pesquisadores para isolados de alimentos e animais (Cerqueira *et al.*, 1997; Meichtri *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2008).

Neste estudo encontrou-se 12 sorotipos/sorogrupos dentre as cepas de STEC. Esta variedade de sorogrupos tem sido observada para amostras de alimentos e de animais (Cergole-Novella *et al.*, 2006). Por outro lado, amostras de origem clínica apresentam menor diversidade sorológica (Nataro e Kaper, 1998; Paton e Paton, 1998).

Os sorogrupos O172 e O87, assim como cepas ONT:H8/H16 encontradas neste estudo, foram também identificados em outras espécies animais, que não bovinos (Vetoratto *et al.*, 2003).

Algumas pesquisas com cepas STEC provenientes de amostras de bovinos relatam sorotipos/sorogrupos semelhantes aos encontrados neste estudo, assim como também cepas identificadas como ONT. Oliveira *et al.* (2008), no Brasil, identificaram dentre as cepas provenientes de amostras de fezes de bovinos, os sorogrupos O79, O157 e O178, além de cepas identificadas como ONT.

Midgley *et al.* (1999), na Austrália, identificaram os sorotipos/sorogrupos O136:H16, ONT:H2, ONT:H8, ONT:H21, ONT:H16 e ONT:H7.

Parma *et al.* (2000) encontraram os sorogrupos O38 e O79, além de 13 cepas que foram consideradas não tipificáveis.

Brett *et al.* (2003a), dentre as cepas STEC, identificaram O157:H7, ONT:H2, ONT:H7, ONT:H8, ONT:H16 e ONT:H21.

Blanco *et al.* (2004b) avaliaram cepas STEC e dentre os sorotipos/sorogrupos encontrados, O157:H7 e O177:H- coincidem com os sorotipos desta pesquisa.

Em outra pesquisa feita por Blanco *et al.* (2004a), foram caracterizadas cepas STEC, sendo divididas nos sorotipos/sorogrupos O79, O178, O38:H21, O136:H16, O157:H7, O177:H-, ONT:H-, ONT:H2, ONT:H8 e ONT:H21.

Cepas identificadas como ONT:HNT/H7 também foram encontradas por Bergamini *et al.* (2007) em amostras de carne de São Paulo.

Devido justamente à maior diversidade encontrada entre isolados provenientes de bovinos, os sorotipos/sorogrupos relatados nesta pesquisa diferem de alguns outros estudos. Entretanto, a maioria desses estudos também relata cepas não tipificáveis. Leomil *et al.* (2003) no Estado de São Paulo, avaliaram cepas STEC em bovinos saudáveis e com diarreia e encontraram cepas O22:H16, O111:H-, ONT:H16, ONT:H18, ONT:H34 e ONT:HNT.

Lira *et al.* (2004) identificaram dentre as STEC provenientes de sete Estados brasileiros, os sorogrupos O26, O55, O111 e O119, nenhum em comum com os resultados deste estudo, porém as cepas avaliadas pelos pesquisadores eram provenientes de amostras de leite de bovinos com mastite clínica e sub-clínica.

Na Suíça, Zweifel *et al.* (2005) caracterizaram cepas STEC de amostras de fezes de bovinos de corte, sendo a maioria dessas sorotipificadas como O103:H2, O113:H4, O116:H- e ONT:H-. A única semelhança foi o sorogrupo O136, sendo neste estudo O136:H16 e por aqueles autores identificados como O136:H- e O136:H2.

Dentre os sorogrupos STEC mais freqüentemente envolvidos em surtos de ETA em todo o mundo destacam-se O26, O48, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O145 e O157 (Mainil e Daube, 2005; Perelle *et al.*, 2007). Somente cepas pertencentes ao sorotipo O157:H7 (7 – 14%) foram encontradas dentre as 50 cepas STEC deste estudo, sendo seis de amostras de fezes e uma de amostra de carcaça.

Resultados relatados por outros pesquisadores com relação ao percentual de cepas dos sorogrupos mais freqüentemente envolvidos em surtos, dentre as STEC, são de maneira geral, superiores aos obtidos no presente estudo.

Leomil *et al.* (2003) encontraram, dentre os sorogrupos identificados nas 24 cepas STEC isoladas de amostras de fezes de 20 bovinos saudáveis e com diarreia no Brasil, oito (33,3%) pertencentes a dois sorogrupos dos mais comumente envolvidos em surtos (O111 e O113). Entretanto nenhuma cepa foi identificada como O157:H7.

Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) caracterizaram 24 cepas STEC isoladas de fezes de novilho do Estado de São Paulo e dentre os sorotipos identificados, sete (29,2%) cepas pertenceram aos sorogrupos mais freqüentemente causadores de surtos (O48, O103 e O111 – cinco cepas), porém o sorotipo O157:H7 não foi identificado.

Das 70 STEC isoladas por Orden *et al.* (2002) de amostras de fezes de bovinos na Espanha, 14 (20%) pertenceram a sorogrupos freqüentemente isolados de surtos (O91, O103, O111 e O113), sendo que o sorotipo O157 não foi detectado.

Blanco *et al.* (2004b) encontraram entre 131 cepas STEC provenientes de fezes de bovinos da Argentina, 37 (28,2%) pertencentes aos sorogrupos mais freqüentemente isolados de surtos, sendo cinco cepas sorotipificadas como O157:H7. Semelhantemente, Meichtri *et al.* (2004) também trabalhando na Argentina com 86 isolados de bovinos, identificaram 28 (32,5%) cepas pertencentes aos sorogrupos O91, O103, O104, O113, O121, O145 e uma cepa O157:H7.

Dentre as 44 cepas STEC provenientes de bovinos criados em confinamento na Argentina e caracterizados por Padola *et al.* (2004), 14 (31,8%) pertenceram aos sorogrupos mais comumente envolvidos em surtos (O103, O145 e O157).

As cepas que apresentaram o gene *uidA* (específico para o sorotipo O157:H7) (Tabela 11) foram confirmadas através da sorotipificação como *E. coli* O157:H7, com exceção de uma cepa não fermentadora de sorbitol proveniente de fezes (cepa n° 024-). Esta cepa embora tenha apresentado o gene *uidA*, com a mesma substituição de base encontrada em cepas O157:H7, foi sorotipificada como O97:H1.

Nossos dados corroboram a utilidade da determinação da presença de *uidA* como forma de triagem para a presença de *E. coli* O157:H7, principalmente quando se trabalha com um elevado número de isolados. A sorotipificação, apesar de sua grande importância na identificação de sorotipos enteropatogênicos de *E. coli*, é realizada por poucos laboratórios em nosso país. Já a PCR é uma técnica mais acessível aos diferentes laboratórios.

A frequência de O157:H7 dentre as STEC deste estudo foi de 14% (7/50), sendo seis cepas provenientes de amostras de fezes (uma cepa isolada do conjunto de animais Angus puro, três de animais distintos também Angus puro e as outras duas de dois desses mesmos animais, porém coletadas em datas diferentes). A outra cepa O157:H7 foi proveniente de amostra de superfície externa da carcaça de um animal Nelore.

A taxa de isolamento de STEC não-O157 foi bem superior à de STEC O157, estes dados estão em concordância com diversas pesquisas tanto com fezes de animais como com carne (Johnson *et al.*, 1996; Pradel *et al.*, 2000; Djordjevic *et al.*, 2001; Arthur *et al.*, 2002; Hornitzky *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2003). Com isso, comprova-se que os humanos estão muitas vezes mais expostos a cepas STEC não-O157 do que STEC O157 (Vanselow *et al.* 2005).

Neste estudo a frequência de O157:H7 foi de 1,2% do total de 583 isolados de fezes e carcaças avaliados. Uma das hipóteses para explicar esta baixa ocorrência é que a eliminação de O157:H7 nas fezes dos bovinos tende a ser intermitente e de curta duração, fato que pode prejudicar sua detecção (Doyle *et al.*, 1997). Outra hipótese é que este sorotipo não é realmente freqüente entre os animais de nosso país, o que parece ser o mais provável.

Por outro lado, se for considerado o total de animais avaliados neste estudo, 60 (12 animais x 5 raças), a frequência de STEC nas fezes dos animais será de 63,3% e do sorotipo O157:H7 será de 10%. Quanto às carcaças dos mesmos animais, teremos uma ocorrência de 15% e 1,7%, respectivamente para STEC e para o sorotipo O157:H7.

Esse percentual de O157:H7 nas amostras de fezes de bovinos está acima do relatado por Irino *et al.*, 2005. Segundo esses autores, este sorotipo é extremamente raro no Brasil em amostras de fezes de bovinos, sendo a frequência de aproximadamente 0,6%. Eles encontraram duas cepas O157:H7 isoladas de amostras de fezes de bovinos leiteiros no Estado de São Paulo, porém estas cepas, apesar de possuírem *stx*<sub>2</sub>, não apresentaram produção de Stx.

STEC O157:H7 foi descrita pela primeira vez no Brasil, em isolados de bovinos de corte e de leite no Rio de Janeiro (Cerqueira *et al.*, 1999) e posteriormente foi descrita em isolados clínicos e de animais de outras regiões (Farah *et al.*, 2007; Irino *et al.*, 2002).

A frequência de O157:H7 dentre as STEC, encontrada neste estudo, é bastante semelhante à encontrada por Guth *et al.* (2003), em um estudo comparativo entre isolados de bovinos e de alimentos provenientes da Argentina e do Brasil. Dentre as cepas STEC provenientes do Brasil, 15% eram do sorotipo O157:H7, todas provenientes de amostras de animais. A ocorrência deste sorotipo entre as cepas provenientes da Argentina foi bem maior, 40,9%, sendo que 50% destas eram provenientes de amostras de animais.

Também semelhante aos nossos resultados, Varela-Hernández *et al.* (2007) encontraram, no México, *E. coli* O157:H7 em 2,7% das amostras de carcaças bovinas examinadas. Eles relatam ainda que outras STEC não-O157 foram mais frequentes (20,5%) e que do total de 146 cepas isoladas, somente duas apresentaram genes de virulência, sendo uma O157:H7 que apresentou os genes *stx*<sub>2</sub> e *eaeA*, e uma não-O157 que possuía apenas o gene *stx*<sub>1</sub>.

Na Europa, América do Norte e Ásia a frequência de bovinos que carregam STEC varia de 10 a 80% (Beutin *et al.*, 1997). Já em amostras de carcaças e carne bovina da Europa a frequência de O157:H7 varia de 0 – 4% (Mainil e Daube, 2005).

Nos Estados Unidos, o estudo de Barkocy-Gallagher *et al.* (2003) apresenta valores diferentes dos relatados por Beutin *et al.* (1997). Eles verificaram que a ocorrência de O157:H7 em fezes de bovinos de corte varia de 0,3 a 12,9%, em amostras de couro de 29,4 a 73,8% e em amostras de carcaça varia de 1,2 a 40,8% antes da evisceração e de 0 a 3,1% pós-evisceração, sempre apresentando percentual maior nos meses quentes.

Alam e Zurek (2006), nos Estados Unidos, observaram que 9,2% das amostras de fezes de bovinos criados em confinamento estavam contaminadas com *E. coli* O157:H7. Woerner *et al.* (2006) também pesquisaram a presença de *E. coli* O157 em bovinos criados em confinamento nos Estados Unidos e encontraram 24,7% das amostras de fezes, positivas para O157. Na avaliação de carcaças, a frequência de O157 foi menor, ficando ao redor de 10,1% para as carcaças antes e 1,4% para depois da evisceração.

Já em estudo comparativo sobre a ocorrência de *E. coli* O157 em gado leiteiro nos Estados Unidos e na Noruega (LeJeune *et al.*, 2006), verificou-se que o sorotipo não foi encontrado entre as amostras da Noruega, mas o foi em uma baixa percentagem (0,67%) nas amostras dos Estados Unidos. Os genes para produção de Stx foram encontrados em 61% das amostras de outros sorotipos da Noruega e

em 14,4% das amostras dos Estados Unidos, fato que, segundo os autores, reflete diferenças na distribuição geográfica.

McEvoy *et al.* (2003) avaliaram, na Irlanda, a presença de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes, do rúmen e das carcaças de bovinos e encontraram 2,4%, 0,8% e 3,2% das amostras, respectivamente, positivas para o microrganismo. Os autores salientam que os resultados confirmam a hipótese de que *E. coli* O157:H7 geralmente não se prolifera no rúmen do bovino adulto e sim no intestino.

Mora *et al.* (2005) na Espanha, encontraram O157:H7 em 15,9% das 514 cepas STEC provenientes de bovinos. Por outro lado, outros sorotipos não-O157 foram muito mais freqüentes (84%). Dentre as cepas O157:H7, 46 apresentaram o gene *stx*<sub>2</sub>, duas possuíam o gene *stx*<sub>1</sub> e 34 ambos. Já entre as demais cepas, 99 foram positivas para o gene *stx*<sub>1</sub>, 232 para o gene *stx*<sub>2</sub> e 101 para ambos.

Este é o primeiro relato de isolamento de cepas O157:H7 a partir de amostra de carcaça bovina e também de fezes de bovinos saudáveis criados em confinamento no Brasil.

Os resultados deste estudo demonstram ainda que cepas STEC não-O157 são mais freqüentes em fezes de bovinos de corte em nosso país e que a transferência de STEC às carcaças é baixa devido ao emprego de boas práticas de produção pelos frigoríficos.

Nossos dados podem ainda explicar a baixa ocorrência de SHU no Brasil, uma vez que a freqüência de sorogrupos de STEC reconhecidamente patogênicos a humanos é bastante baixa e predomina em amostras de fezes de bovino e não em carcaças.

#### 4.5 Avaliação da presença dos genes das variantes de intimina

Dentre a diversidade de variantes do gene *eae* descritas na literatura, segundo Garrido *et al.* (2006) são 16 diferentes tipos e subtipos de intimina, neste estudo foram avaliadas a presença dos genes *eae*- $\alpha$ , *eae*- $\gamma$ , *eae*- $\beta$ , *eae*- $\epsilon$ , *eae*- $\zeta$ , *eae*- $\iota$ , *eae*- $\eta$ , *eae*- $\kappa$  e *eae*- $\theta$ .

Do total de 21 cepas, nas quais havia sido detectada a presença do gene *eaeA* (item 4.2), e que foram submetidas a avaliação da presença dos genes para as variantes de intimina, oito (38,1%) apresentaram resultado positivo. Dessas, a maioria (sete) foi positiva para a variante de intimina *eae-γ* enquanto a cepa restante foi positiva para a variante *eae-β*. Esta última cepa era proveniente de amostras de fezes e foi sorotipificada como O79:H14.

Os resultados típicos encontrados para a PCR das variantes *eae-γ* e *eae-β*, pode ser observado na Figuras 06.

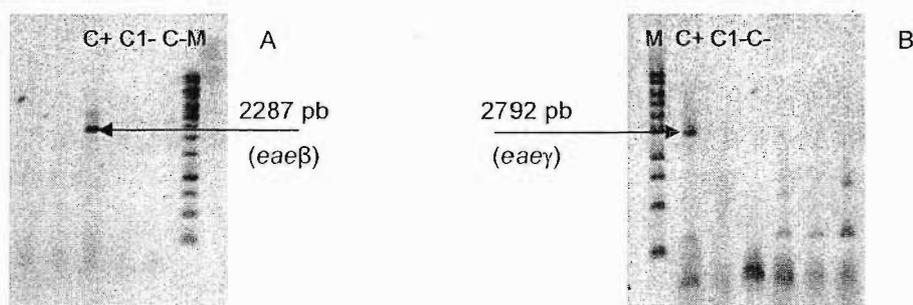


Figura 06 – Detecção dos genes *eaeβ* (A) e *eaeγ* (B), por PCR segundo Oswald *et al.* (2000) e Schmidt *et al.* (1993), respectivamente. M: marcador de peso molecular (1 kb); C+: cepa controle positivo (Tabela 01); C-: *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

As sete cepas que apresentaram a variante *eae-γ* foram seis O157:H7 (cinco proveniente de amostras de fezes e uma de carcaça) e a cepa O97:H1 *uidA*-positiva (proveniente de amostras de fezes). Esse resultado demonstra a existência de semelhanças entre a cepa O97:H1 *uidA*-positiva e cepas O157:H7.

Em 13 cepas (61,9%) não foram identificadas as variantes de intimina estudadas. Este resultado está de acordo com o relatado por outros pesquisadores que verificaram que algumas cepas de STEC e EPEC expressam intimina que não são típicas (China *et al.*, 1998; Pelayo *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam ausência de variantes de intimina *eae-α*, *eae-η* e *eae-κ*. As variantes *eae-ε*, *eae-ζ*, *eae-ι* e *eae-θ* também não foram detectadas entre as cepas avaliadas, porém em virtude da não obtenção de cepa padrão, esses resultados devem ser considerados com cautela.

Apesar disso, resultados relatados por outros pesquisadores (Oswald *et al.*, 2000; Spears *et al.*, 2006) indicam que algumas dessas variantes são grupo ou sorogrupo específicas, sendo que estes não faziam parte das cepas deste estudo. A variante *eae-ε* é encontrada em cepas STEC sorogrupo O103 provenientes de amostras de humanos e bovinos. Já o subtipo *eae-α* é expresso por cepas de EPEC.

Semelhante aos resultados desta pesquisa, alguns estudos relatam a detecção de *eae-γ* e *eae-β*, porém também demonstram detecção de outras variantes de intimina. No Brasil, Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) identificaram os genes para as variantes de intimina de cepas STEC provenientes de amostras de bovinos. Eles identificaram nove cepas O111 positivas para *eae-γ2/θ*, três cepas (uma O7 e duas O123) apresentando *eae-ε1* e duas cepas, uma O118 e outra ONT, positivas para *eae-β1*.

Oswald *et al.* (2000) caracterizaram os genes para as variantes de intimina de cepas STEC e EPEC provenientes de amostras de humanos e animais de diversos países. Os pesquisadores encontraram apenas cepas EPEC positivas para a variante *eae-α1/α2*. Dentre as cepas que apresentaram o gene *eae-ε* foram identificadas apenas cepas STEC pertencentes aos sorogrupos O8, O11, O45, O103, O121 e O165 e dentre as cepas positivas para *eae-γ1/γ2*, foram identificados os sorogrupos STEC O86, O111, O145 e O157. As cepas STEC dos sorogrupos O18, O26, O45, O118 e O123 foram positivas para *eae-β*.

Blanco *et al.* (2004a), na Espanha, avaliaram os genes das variantes de intimina de cepas STEC provenientes de amostras de bovinos. Das cepas que apresentaram a variante *eae-β1*, foram identificados os sorogrupos O26, O118, O126, O177 e ONT, as cepas O157 foram positivas para a variante *eae-γ1* e cepas O111 positivas para *eae-γ2*. Em cepas dos sorogrupos O103, O136, O163 e O165 foi detectada a variante *eae-ε*; cepas dos sorogrupos O84, O138, O150, O156 e ONT foram positivas para a variante *eae-ζ* e uma cepa O49 positivo para *eae-δ*. Os autores ainda relataram a detecção de um novo gene de variante de intimina, que chamaram de *eae-ξ* (xi), presente em duas cepas do sorogrupo O80.

Em isolados provenientes de amostras de bovinos da Argentina, Blanco *et al.* (2004b) identificaram as variantes de intimina em todas as cepas positivas para o gene *eae*. Sete cepas O26 e quatro O5 apresentaram a variante *eae-β1*, 16 cepas

possuíram o gene *eae-γ1* (11 O145 e cinco O157), cinco cepas O103 foram positivas para a variante *eae-ε1* e uma cepa O111 mostrou-se positiva para a variante *eae-θ/γ2*.

Em outro trabalho de Blanco *et al.* (2005), mas realizado na Suíça, os autores identificaram os genes para as variantes de intimina em todas as cepas STEC *eae*-positivas proveniente de bovinos. Sendo dez O103 positivas para a variante *eae-ε1*, cinco O145 e uma O157 positivas para *eae-γ1*, duas O5 e duas O26 positivas para *eae-β1* e uma O111 positiva para *eae-γ2/θ*.

Em 2007, Mora *et al.*, na Espanha, pesquisaram os genes das variantes de intimina entre as cepas STEC de amostras de carne moída. Dentre as 25 cepas positivas para a presença do gene *eae*, as cepas O157 apresentaram a variante *eae-γ1*, as cepas O5, O15, O26, O118 e O174 foram positivas para *eae-β1*. Enquanto *eae-ε1* foi encontrado em cepas O103 e *eae-θ* em cepas O111.

## 4.6 Avaliação da atividade citotóxica

### 4.6.1 Citotoxicidade em células Vero

Das 66 cepas avaliadas, 28 (42,4%) apresentaram capacidade de destruir a monocamada de células Vero. Destas, 12 (42,9%) apresentaram o gene *stx<sub>2</sub>*; 10 (35,7%) foram positivas para o gene *stx<sub>1</sub>*, enquanto cinco (17,8%) apresentaram ambos os genes. Uma cepa (3,6%) não possuía genes para produção de toxina de Shiga (Tabela 15). Esta cepa, que não apresentou os genes para produção de Stx, mas mostrou-se positiva para a destruição da monocamada de células Vero, pode expressar outras toxinas cujos genes não foram pesquisados neste estudo, conforme verificado por Bettelheim e Beutin (2003).

Um total de 38 cepas não apresentou citotoxicidade no ensaio com células Vero. Dessas, 23 eram STEC, 14 (nove provenientes de fezes e cinco de carcaças) possuíam o gene *stx<sub>1</sub>*, cinco cepas provenientes de fezes possuíam o gene *stx<sub>2</sub>*, uma cepa proveniente de amostras de fezes apresentou ambos os genes e três cepas provenientes de amostras de água apresentaram o gene *stx<sub>2e</sub>*.

Tabela 15 – Distribuição dos genes *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> nas cepas que apresentaram citotoxicidade em células Vero.

Genes ( <i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> ) (n <sup>o</sup> )	Cepas citotóxicas à células Vero Origem (n <sup>o</sup> de cepas) (%)
<i>stx</i> <sub>2</sub> (17)	Fezes (9); carcaça (3) (42,9%)
<i>stx</i> <sub>1</sub> (24)	Fezes (9); carcaça (1) (35,7%)
<i>Stx</i> <sub>1</sub> e <i>stx</i> <sub>2</sub> (6)	Fezes (5) (17,8%)
ausência de <i>stx</i> <sub>1</sub> e <i>stx</i> <sub>2</sub> (19)	Água (1) (3,6%)

▪Número total de cepas positivas para a presença do(s) gene(s) na avaliação por PCR

Os resultados apresentados acima referem-se a avaliação da citotoxicidade em cultura de células Vero segundo metodologia proposta por Konowalchuk *et al.* (1977).

Em virtude de algumas cepas STEC (23) não terem apresentado resultado positivo no ensaio, decidiu-se então pela repetição do mesmo, porém empregando a metodologia preconizada por Karmali *et al.* (1985). Tal metodologia foi escolhida por utilizar sulfato de polimixina B, um antibiótico efetivo para a extração de proteínas intracelulares de bactérias Gram negativas, uma vez que a toxina Stx pode ser encontrada em altas concentrações no espaço intracelular. Desta forma realizou-se o ensaio com e sem a utilização de sulfato de polimixina B.

Por esta metodologia, o meio de cultura utilizado para obtenção do sobrenadante celular deve garantir a melhor multiplicação do microrganismo e não deve conter agentes que influenciem a atuação do antimicrobiano. Segundo Karmali *et al.* (1985), o meio de cultura a ser utilizado deve ser o caldo Penassay.

Além das cepas STEC, mais 11 cepas que apresentaram na PCR genes para a produção de intimina também foram submetidas a esta avaliação.

Foi possível observar que não houve diferença entre a citotoxicidade ocasionada pelos sobrenadantes bacterianos provenientes de culturas tratadas com sulfato de polimixina B ou não, pois os resultados para todas as cepas testadas foram iguais independentemente do tratamento.

O resultado deste experimento demonstrou que apenas duas cepas (5,9%) dentre as 34 testadas mostraram-se citotóxicas às células Vero por esta nova metodologia. Ambas eram fermentadoras de sorbitol, proveniente de amostras de fezes de animais diferentes (032+ e 376+) e positivas para a presença do gene *stx*<sub>1</sub>.

Desta forma, o resultado final para citotoxicidade em células Vero é de 30 cepas (45,4%) com capacidade de destruir a monocamada de células Vero, sendo que destas, 29 (96,7%) apresentaram os genes *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> e apenas uma (3,6%) não possuía genes para produção de Stx. Por outro lado, 21 cepas STEC não apresentaram citotoxicidade.

O resultado positivo, no segundo ensaio, para as duas cepas que não haviam apresentado citotoxicidade na primeira avaliação, deve-se a outros fatores não relacionados ao emprego do sulfato de polimixina B. Uma hipótese para explicar este acontecimento é que o meio utilizado na segunda avaliação apresenta em sua formulação extrato de levedura, ausente no primeiro, e esse enriquecimento do meio pode ter ocasionado melhor desenvolvimento do microrganismo e assim melhores condições para que o mesmo produzisse a toxina.

Contudo, como não houve diferença entre a utilização ou não do antibiótico, podemos afirmar que a primeira metodologia (preconizada por Konowalchuk *et al.*, 1977), no caso de isolados de animais, pode ser utilizada com o acréscimo de algum componente que torne o meio de cultura enriquecido como é o caso do extrato de levedura, por essa metodologia o meio de cultura utilizado foi o TSB. Estudos precisam ser conduzidos para validar essa proposta.

Outros trabalhos também relatam a ocorrência de cepas STEC que não apresentam citotoxicidade à cultura celular. No Brasil, Bastos *et al.* (2006) avaliaram cepas STEC O157 proveniente de bovinos e encontraram seis cepas (54,5%) que não apresentaram atividade citotóxica à células Vero e HeLa.

Jo *et al.* (2004), na Coreia, avaliaram a presença dos genes e a citotoxicidade em células Vero de cepas de *E. coli* O157 proveniente de fezes e de carne de bovinos, suínos e aves. Os pesquisadores criaram uma escala arbitrária variando de um a dez para avaliar a citotoxicidade às células, sendo que quanto maior o dano causado à cultura, maior o valor atribuído. Dentre as cepas avaliadas, os autores observaram que as cepas *stx*<sub>2</sub>-positivas revelaram-se mais citotoxigênicas, mas por outro lado, algumas cepas *stx*<sub>2</sub>-positivas não apresentaram atividade citotóxica e algumas cepas *stx*-negativas mostraram citotoxicidade.

A evidência de cepas STEC provenientes de amostras animais sem capacidade de destruir a monocamada de células Vero pode estar associada ao fato de que

cepas STEC isoladas de pacientes com SHU produzem níveis significativamente maiores de Stx1 e/ou Stx2 do que cepas isoladas de bovinos (Ritchie *et al.*, 2003).

Ainda assim, algumas pesquisas relatam isolados clínicos de STEC incapazes de alterar a monocamada celular. Zhang *et al.* (2005), na Alemanha, avaliaram a citotoxicidade em células Vero de 37 cepas STEC *stx*<sub>2</sub>-positivas provenientes de humanos assintomáticos, com diarreia e com SHU, e evidenciaram seis cepas (16,2%) negativas no ensaio com cultura celular, sendo dessas, cinco provenientes de amostras de humanos assintomáticos e uma de humano com diarreia. Os pesquisadores afirmam que a detecção fenotípica de Stx deixa a desejar quando se trata de cepas STEC que secretam baixos níveis de toxina.

Jinneman *et al.* (2000) avaliaram isolados clínicos e encontraram cepas que possuíam *stx*<sub>2</sub>, mas que não eram citotóxicas à células Vero. Eles verificaram que *stx*<sub>2</sub> possuía uma inserção de 1310 pb que tornava a toxina inativa.

Friedrich *et al.* (2002) avaliaram a citotoxicidade de cepas STEC de isolados clínicos e evidenciaram que cinco das 15 cepas que apresentaram o gene *stx*<sub>2d</sub> e uma dentre as 12 que possuíam *stx*<sub>2e</sub> não foram citotóxicas em células Vero. Segundo os autores, a razão para a falta de expressão da toxina ainda não estava clara, sendo que algumas hipóteses podiam ser levantadas: (1) a proteína poderia não estar sendo expressa devido a mutação do gene; (2) o gene poderia não estar sendo expresso devido às condições de multiplicação utilizadas; e (3) a toxina foi sintetizada mas não foi liberada para o meio externo por algum defeito no mecanismo de exportação da mesma. Os autores ainda afirmam que, devido às diferenças entre o ambiente *in vivo* e as condições de laboratório, a não detecção da produção da toxina não significa que a mesma não possa ser produzida durante a infecção.

Para identificar o tipo de citotoxina produzida pelo microrganismo nos ensaios com células Vero haveria necessidade de realização de testes adicionais neutralizando-se os sobrenadantes das culturas com anti-soros específicos, recurso este, que infelizmente não dispomos em nossos laboratórios.

Apesar de a avaliação da produção de citotoxinas ser tradicionalmente realizada empregando-se cultivos celulares, esses ensaios só podem ser executados em poucos laboratórios face a dificuldade em obter e manter as linhagens celulares. A alternativa de utilização de métodos mais simples, como o

ensaio imunocromatográfico, permite que mesmo laboratórios menos equipados possam avaliar o potencial citotóxico de seus isolados.

#### 4.6.2 Avaliação da produção de toxina da Shiga por ensaio imunocromatográfico

O ensaio indicou que 17 (34%), das 50 cepas STEC testadas, eram produtoras de Stx, sendo oito (47,1%) positivas para a produção de Stx2, seis (35,3%) positivas para Stx1 e outras três (17,6%) para ambas as toxinas (Tabela 16). Todas estas cepas apresentaram na PCR os genes correspondentes à toxina identificada pelo Duopath®, com exceção de uma cepa de carcaça que foi positiva para a produção de ambas as toxinas, porém com gene apenas para a toxina Stx2. Possivelmente essa cepa tenha produzido uma variante de Stx1, cujo o gene não foi detectado pelo *primer* para *stx*<sub>1</sub> utilizado na PCR.

Um total de 33 cepas STEC apresentou os genes de *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> e/ou as variantes desses, porém a produção de toxina Stx não foi detectada pelo Duopath® (Tabela 16). Destas, 18 cepas (54,5%) possuíam o gene *stx*<sub>1</sub>, oito (24,2%) o gene *stx*<sub>2</sub>, quatro (12,1%) ambos os genes para as toxinas e três (9,1%) possuíam o gene *stx*<sub>2</sub>e.

Tabela 16 – Relação entre a capacidade de produção de Stx, avaliada por ensaio imunocromatográfico (Duopath Verotoxin®) e presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> por cepas STEC.

Genes ( <i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> ) (n <sup>o</sup> )	Produção de Stx Duopath®	Origem (n <sup>o</sup> de cepas) (%)
<i>stx</i> <sub>1</sub> (24)	Stx1	Fezes (6) (35,3%)
<i>stx</i> <sub>2</sub> (17)	Stx2	Fezes (6); carcaça (2) (47,1%)
	Stx1 e Stx2	Carcaça (1)
<i>stx</i> <sub>1</sub> e <i>stx</i> <sub>2</sub> (6)	Stx1 e Stx2	Fezes (2) (17,6%)

<sup>a</sup>n é o número total de cepas que apresentaram-se positivas para a presença do(s) gene(s) para produção de Stx na avaliação por PCR

Comparando os resultados obtidos na avaliação da presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub> por PCR, citotoxicidade em células Vero e ensaio imunocromatográfico (Duopath®), observa-se que 17 cepas (34%) do total de 50 STEC, apresentaram resultado positivo nas três metodologias (Tabela 17), enquanto 12 cepas (24%) STEC foram citotóxicas para células Vero, mas não demonstraram produção de toxina pelo ensaio imunocromatográfico. Destas, cinco cepas de fezes e uma de carcaça possuíam o gene *stx*<sub>1</sub>, três de fezes apresentaram o gene *stx*<sub>2</sub> e outras três possuíam ambos os genes para Stx.

As demais 21 cepas STEC (42%) apresentaram os genes, mas não foram citotóxicas e nem apresentaram produção de Stx pela avaliação imunocromatográfica. Destas, sete cepas proveniente de fezes e cinco de carcaças foram positivas para *stx*<sub>1</sub>, duas cepas de fezes positivas para *stx*<sub>2</sub>, uma cepa de fezes positiva para *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>, três cepas provenientes de amostras de água foram positivas para *stx*<sub>2e</sub>, duas cepas de fezes positivas para os genes *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>2f</sub> e uma cepa de fezes positiva para *stx*<sub>2</sub> e *stx*<sub>2c</sub>. A hipótese mais provável para explicar este fato é que a produção de Stx por estas cepas não tenha atingido níveis detectáveis pelos ensaios, principalmente aquelas que apresentam a variante *stx*<sub>2f</sub>, uma vez que cepas produtoras dessa variante, reconhecidamente apresentam produção reduzida da toxina (Koitabashi *et al.*, 2006). Outra hipótese é que não tenha ocorrido a expressão dos genes.

Tabela 17 – Avaliação da citotoxicidade em células Vero, presença dos genes codificadores de Stx e detecção e identificação de Stx por teste imunocromatográfico por 50 cepas de *E. coli* STEC.

Citotoxicidade em Cél. Vero	Presença de <i>stx</i> <sub>1</sub> e/ou <i>stx</i> <sub>2</sub>	Tipo de Stx produzida (Duopath®)	Origem (nº total - %)
+	<i>stx</i> <sub>1</sub>	Stx1	Fezes (6 – 12%)
+	<i>stx</i> <sub>2</sub>	Stx2	Fezes (6 – 12%)
+	<i>stx</i> <sub>2</sub>	Stx2	Carcaça (2 – 4%)
+	<i>stx</i> <sub>2</sub>	Stx1 e Stx2	Carcaça (1 – 2%)
+	<i>stx</i> <sub>1</sub> ; <i>stx</i> <sub>2</sub>	Stx1 e Stx2	Fezes (2 – 4%)
+	<i>stx</i> <sub>1</sub>	-	Fezes (5 – 10%)
+	<i>stx</i> <sub>1</sub>	-	Carcaça (1 – 2%)
+	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	Fezes (3 – 6%)
+	<i>stx</i> <sub>1</sub> ; <i>stx</i> <sub>2</sub>	-	Fezes (3 – 6%)
-	<i>stx</i> <sub>1</sub>	-	Fezes (7 – 14%)
-	<i>stx</i> <sub>1</sub>	-	Carcaça (5 – 10%)
-	<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	Fezes (5 – 10%)
-	<i>stx</i> <sub>1</sub> ; <i>stx</i> <sub>2</sub>	-	Fezes (1 – 2%)
-	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	-	Água (3 – 6%)

A ausência da expressão dos genes pode ser relacionada à ausência de genes reguladores de transcrição, uma vez que estes estão freqüentemente presentes em elementos genéticos móveis (Kaper *et al.*, 2004).

Estas mesmas hipóteses podem explicar porque sete cepas que apresentaram o gene *ehxA*, não apresentaram produção de entero-hemolisina.

Dentre as cepas STEC em que a Stx pode ser identificada pelo ensaio imunocromatográfico, salienta-se oito (16%), nas quais a toxina identificada foi Stx2, sendo duas destas provenientes de carcaças (3,3% do total de 60 carcaças avaliadas) e as demais de fezes. Estes resultados são de extrema importância para saúde pública, uma vez que cepas produtoras de Stx2 parecem estar mais envolvidas com casos de doenças graves do que cepas produtoras apenas de Stx1 ou de Stx1 e Stx2 (Caprioli *et al.*, 2005; Mainil e Daube, 2005; Zaki e El-Adrosy, 2007).

Também cabe ressaltar que, além do sorotipo O157:H7, outras cepas STEC pertencentes a outros sorotipos/sorogrupos mostraram-se citotóxicas às células Vero e/ou tiveram a produção de Stx identificada pelo ensaio imunocromatográfico. Dentre estes, os sorotipos O38:H21 (três cepas), O79:H14 (2), O85:H7 (1), O97:H1 (1), O102:H21 (1), O136:H16 (2), O157:H7 (7), O172:H- (1), O177:H- (2), O178:H- (1), e ainda nas cepas não tipificáveis: ONT:H7 (3), ONT:H8 (1), ONT:H21 (1) e ONT:HNT (1).

#### **4.7 Avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR para detecção de genes para Stx e do teste imunocromatográfico (Duopath®)**

Para avaliar a sensibilidade e especificidade, tanto da PCR quanto do ensaio imunocromatográfico, em relação ao teste padrão empregado (citotoxicidade em células Vero) utilizou-se os cálculos propostos por Feldsine *et al.* (2002).

Verificou-se para a PCR que a sensibilidade foi de 96,7% e a especificidade de 41,7%; para o ensaio imunocromatográfico a sensibilidade foi de 56,7% e a especificidade de 100%.

Estes dados indicam que os resultados obtidos com os dois testes são complementares. Enquanto a PCR apresenta uma boa sensibilidade, ou seja, permite detectar corretamente os genes, o teste imunocromatográfico apresentou uma ótima especificidade, ou seja, não apresentou resultados falso positivos.

O baixo valor de sensibilidade verificado no teste imunocromatográfico foi devido ao número de cepas positivas para o teste de citotoxicidade em células Vero, mas negativas nesse (13) sendo que as razões para esses resultados negativos já foram anteriormente abordadas.

Já o baixo valor de especificidade verificado para a PCR está relacionado à frequência de cepas (21) que abrigam os genes *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub>, mas que não os expressam. Contudo a PCR pode e deve ser utilizada como ferramenta auxiliar para estudos epidemiológicos de STEC, mas sua utilidade na identificação de cepas causadoras de doença é limitada.

Apesar destas limitações, tais metodologias são de grande valia para pesquisas, pois oferecem resultados complementares aos resultados obtidos através

da avaliação da citotoxicidade em células Vero, ou mesmo permitem uma avaliação quando não se pode realizar o teste padrão.

#### 4.8 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As 66 cepas analisadas por PFGE, empregando-se a enzima de restrição XbaI, resultaram em 29 perfis distintos, (Tabela 18), sendo 12 destes exclusivos para uma única cepa.

Nota-se na Tabela 18 que a maioria dos perfis agrupou cepas pertencentes a diferentes sorogrupos/sorotipos e origens, fato que salienta a existência de uma origem clonal comum dentre as cepas desses perfis. Exceção são os perfis P1, P11, P15, P17, P19 e P20 que agruparam somente cepas de mesmo sorotipos e provenientes de mesma origem.

O grande número de perfis encontrados neste estudo para as cepas STEC está de acordo com os resultados de Bastos *et al.* (2006) que tipificaram por PFGE cepas STEC O157 provenientes de amostras de alimentos, bovinos e casos clínicos da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Uruguai e Estados Unidos. Os autores obtiveram 32 perfis distintos mesmo se tratando de cepas pertencentes a um mesmo sorogrupo. Eles verificaram ainda que entre as cepas que apresentaram 100% de similaridade havia cepas de diversas origens e países.

Na Tabela 19 pode-se observar a distribuição das 50 cepas STEC nos 25 perfis PFGE obtidos por elas (P1 a P8, P10 a P13, P15 a 21, P23 a P27 e P29), assim como a relação desses perfis com a origem das cepas, data da coleta das amostras e sorotipos/sorogrupos.

Tabela 18 – Relação entre os perfis genéticos obtidos com a análise por PFGE e os sorotipos das cepas e a origem das mesmas.

Perfil PFGE (nº de cepas)	Sorotipo (nº de cepas)	Origem
P1 (3)	O157:H7 (3)	Fezes
P2 (1)	O172:H- (1)	Fezes
P3 (1)	O157:H7 (1)	Fezes
P4 (3)	O157:H7 (2); ONT:H16 (1)	Fezes
P5 (2)	O97:H1(1)	Fezes
	O157:H7 (1)	Carcaça
P6 (7)	O38:H21 (3); O136:H16 (2)	Fezes
	ONT:HNT (1)	Água
	O152:H16 (1)	Carcaça
P7 (2)	O178:H- (1); O85:H7 (1)	Fezes
P8 (1)	ONT:HNT (1)	Fezes
P9 (1)	ONT:H8 (1)	Fezes
P10 (8)	O97:H1 (5)	Água
	O79:H14 (1); ONT:H21 (2)	Fezes
P11 (2)	ONT:H10 (2)	Fezes
P12 (2)	ONT:H46 (1); ONT:H21 (1)	Fezes
P13 (4)	OR:H30 (1); OR:HR (1)	Fezes
	ONT:H- (1); ONT:H34 (1)	Carcaça
P14 (1)	ONT:H8 (1)	Fezes
P15 (3)	O87:H25 (3)	Carcaça
P16 (2)	ONT:H21 (1)	Carcaça
	O79:H14 (1)	Fezes
P17 (2)	ONT:H7 (2)	Fezes
P18 (4)	ONT:H8 (3); ONT:H7 (1)	Fezes
P19 (3)	O85:H7 (3)	Fezes
P20 (2)	O177:H- (2)	Carcaça
P21 (3)	ONT:H34 (1); O157:H12 (2)	Fezes
P22 (1)	ONT:H21 (1)	Fezes
P23 (1)	ONT:H7 (1)	Fezes
P24 (1)	ONT:H2 (1)	Fezes
P25 (1)	ONT:H8 (1)	Fezes
P26 (1)	ONT:H31 (1)	Fezes
P27 (1)	O102:H21 (1)	Fezes
P28 (1)	ONT:H2 (1)	Fezes
P29 (2)	ONT:H7 (1); OR:H7 (1)	Fezes

Tabela 19 – Relação entre os perfis PFGE, origem das cepas, data de coleta das amostras e sorotipos/sorogrupos das 50 cepas STEC.

Identificação da cepa	Origem	Data da coleta	Sorotipo/Sorogrupo	Perfil PFGE
001 - <sup>1</sup>	Fezes AP <sup>2</sup>	15/07/02	O157:H7	1
005 -	Fezes SP <sup>3</sup>	15/07/02	O172:H-	2
008 -	Fezes AP176	22/08/02	O157:H7	3
022 -	Fezes AP 155	25/09/02	O157:H7	4
023 -	Fezes AP 161	25/09/02	O157:H7	1
024 -	Fezes AP179	25/09/02	O97:H1	5
040 -	Fezes AP 155	13/11/02	O157:H7	1
041 -	Fezes AP176	13/11/02	O157:H7	4
049 -	Fezes AP176	14/12/02	O38:H21	6
063 -	Fezes AP176	14/12/02	O38:H21	6
064 -	Fezes AP176	14/12/02	O38:H21	6
073 -	Fezes AP176	14/12/02	O178:H-	7
090 -	Fezes AP176	14/12/02	ONT:HNT	8
151 -	Água B15 <sup>4</sup>	17/02/03	O97:H1	10
153 -	Água B15	17/02/03	O97:H1	10
169 -	Água B15	17/02/03	O97:H1	10
185 -	Fezes AP 206	10/03/03	O79:H14	10
194 -	Carcaça SP B621 I <sup>5</sup>	31/10/02	O177:H-	20
195 -	Carcaça SP B621 IR <sup>6</sup>	31/10/02	O177:H-	20
274 -	Carcaça N <sup>7</sup> 852 E <sup>8</sup>	16/01/03	O157:H7	5
005 + <sup>9</sup>	Fezes A ½ <sup>10</sup> 3007	25/09/02	O136:H16	6
006 +	Fezes A ½ 3007	25/09/02	O136:H16	6
032 +	Fezes AP 161	25/09/02	ONT:H16	4
079 +	Fezes AP 183	13/11/02	ONT:H7	23
089 +	Fezes S½ <sup>11</sup> 65	13/11/02	ONT:H2	24
092 +	Fezes S½ 67	13/11/02	ONT:H8	25
093 +	Fezes S½ 68	13/11/02	ONT:H31	26
119 +	Fezes AP s/n° 1	14/12/02	ONT:H34	21
128 +	Fezes AP s/n° 3	14/12/02	ONT:H21	12
151 +	Fezes N 630	14/12/02	ONT:H7	29
153 +	Fezes N 630	14/12/02	OR:H7	29

Cont.

Cont. Tabela 19

170 +	Fezes A ½ 3001	14/01/03	OR:H30	13
186 +	Fezes A ½ 3012	14/01/03	ONT:H7	17
189 +	Fezes A ½ 3017	14/01/03	ONT:H7	17
264 +	Fezes AP 153	10/03/03	ONT:H8	18
267 +	Fezes AP 161	10/03/03	ONT:H8	18
271 +	Fezes AP 158	10/03/03	ONT:H7	18
272 +	Fezes AP 152	10/03/03	O102:H21	27
274 +	Fezes AP 164	10/03/03	O79:H14	16
276 +	Fezes AP 177	10/03/03	O85:H7	19
277 +	Fezes AP 178	10/03/03	O85:H7	19
285 +	Carcaça S½ 68 ER <sup>12</sup>	18/11/02	ONT:H21	16
288 +	Carcaça S½ 72 I	18/11/02	ONT:H34	13
299 +	Carcaça S½ 68 IR	18/11/02	O152:H16	6
302 +	Carcaça S½ 74 E	18/11/02	O87:H25	15
303 +	Carcaça S½ 74 E	18/11/02	O87:H25	15
306 +	Carcaça S½ 74 E	18/11/02	O87:H25	15
347 +	Fezes S½ 75	25/09/02	ONT:H10	11
348 +	Fezes S½ 76	25/09/02	ONT:H46	12
376 +	Fezes SP 362	25/09/02	ONT:H10	11

<sup>1</sup>Cepas Sorbitol Negativo; <sup>2</sup>Raça Angus Puro; <sup>3</sup>Raça Simental Puro; <sup>4</sup>Água da Baía; <sup>5</sup>Carcaça Superfície Interna; <sup>6</sup>Carcaça Superfície Interna Refrigerada; <sup>7</sup>Raça Nelore; <sup>8</sup>Carcaça Superfície Externa; <sup>9</sup>Cepas Sorbitol Positivo; <sup>10</sup>Raça Angus ½ Sangue; <sup>11</sup>Raça Simental ½ Sangue; <sup>12</sup>Carcaça Superfície Externa Refrigerada

Vários perfis (P1, P4, P17, P18, P19 e P21) demonstram claramente a disseminação de cepas geneticamente indistinguíveis entre animais pertencentes a mesma raça/ lote, e ainda, alguns desses perfis (P1 e P4) mostram que estas cepas permanecem entre os animais por longos períodos de tempo (aproximadamente 4 e 2 meses, respectivamente).

As 3 cepas STEC O157:H7 agrupadas no perfil 1 são provenientes de amostras de fezes de bovinos da raça Angus puro, a primeira de uma amostragem do grupo de animais realizada quando eles chegaram ao confinamento, e as outras duas são de dois animais distintos identificados como 155 e 161. As amostras foram coletadas em datas diferentes, havendo intervalo de dois meses entre as coletas. As três cepas ainda apresentam o mesmo genótipo (*ehxA*, *eaeA*, *stx<sub>2</sub>* e *uidA*).

No perfil 4 foram agrupadas outras duas cepas O157:H7 isoladas de animais distintos (155 e 176) da raça Angus puro e coletadas em datas diferentes. Estas cepas apresentaram o mesmo genótipo das cepas O157:H7 pertencentes ao perfil 1. Destaca-se que o animal Angus puro 155 apresentou contaminação por cepas O157:H7 pertencentes a dois perfis distintos (P1 e P4) e provenientes de amostras coletadas em datas diferentes.

As cepas STEC ONT:H7 alocadas no perfil 17 foram isoladas de animais distintos, mas em mesma data e eram provenientes de animais da raça Angus ½ sangue denominados de 3012 e 3017.

No perfil 18 encontram-se três cepas STEC e uma EPEC atípica, todas isoladas de fezes de animais Angus puro. As cepas STEC (duas ONT:H8 e uma ONT:H7) foram coletadas na mesma data dos animais 153, 161 e 158, já a cepa EPEC atípica (ONT:H8) foi coletada em data diferente das demais e do animal s/nº 1.

O perfil 19 além de agrupar cepas provenientes de diferentes animais e datas de coleta, chama a atenção por conter uma cepa EPEC atípica coletada do animal Angus puro s/nº 1. Esta cepa, sorotipificada como O85:H7, foi coletada na mesma data e do mesmo animal que a cepa EPEC atípica do perfil 18, ou seja, confirmação de que existe variabilidade entre as *E. coli* excretadas por um mesmo animal em um mesmo momento.

Uma outra cepa isolada do bovino Angus puro s/nº 1 foi agrupada no perfil 21, porém esta cepa foi coletada em data diferente das duas anteriormente citadas e foi caracterizada como STEC. Ainda neste perfil, encontram-se duas cepas não-STECS (apenas *ehxA*-positivas) isoladas de dois animais distintos Angus puro, identificados como s/nº 3 e 158, mas coletadas no mesmo dia.

Além dos perfis que demonstram a disseminação de cepas entre animais pertencentes a mesma raça, outros perfis (P6, P10, P11, P12 e P13) demonstram essa disseminação entre animais de raças diferentes.

O perfil 6 agrupou seis cepas STEC e uma EPEC atípica. Dentre as STECS, três cepas O38:H21 eram provenientes de colônias diferentes, mas isoladas de uma mesma placa, já que foram todas provenientes das fezes de um mesmo animal (AP 176) e coletadas na mesma data (14/12/02), o mesmo ocorre com duas cepas O136:H16, porém estas são provenientes de um mesmo animal da raça Angus ½ sangue. A outra cepa STEC foi isolada da superfície interna da carcaça do animal

Simental ½ sangue 68 e sorotipificada como O152:H16. A cepa EPEC atípica (ONT:HNT) foi coletada de amostra de água da baía 15.

Interessante notar que neste perfil, além da presença de cepas de mesma origem clonal entre animais Angus puro e ½ sangue, ocorre também a identificação em diferentes amostras (fezes, água da baía e superfície interna de carcaça refrigerada). Este fato sugere a ocorrência de contaminação cruzada na criação de bovinos em estudo.

Todas as cepas O97:H1 agrupadas no perfil 10 foram isoladas de uma mesma amostra (água da baía 15) e mesma data de coleta, sendo portanto provenientes de colônias diferentes isoladas de uma mesma placa. Contudo, estas cepas mostraram-se indistinguíveis de cepas isoladas de fezes de diferentes animais (AP 206, SP B41 e SP Belo), em datas de coleta distintas e sorotipificadas como O79:H14 e ONT:H21 (cepas provenientes dos animais SP).

Uma outra cepa da mesma amostra de água da baía 15 foi alocada no perfil 6 e não foi passível de sorotipificação.

As duas cepas ONT:H10 agrupadas no perfil 11 foram isoladas de amostras de fezes de dois animais distintos, um Simental ½ sangue identificado como 75 e a outra de um animal Simental puro 362, ambas apenas com gene *stx*<sub>1</sub>.

No perfil 12 estão duas cepas isoladas de fezes, uma ONT:H46 do animal 76 Simental ½ sangue apenas com o gene *stx*<sub>1</sub> e a outra, uma ONT:H21 do animal Angus puro s/nº 3 apenas com o gene *stx*<sub>2</sub>. Deste último animal, identificou-se outra cepa coletada em mesma data pertencente ao perfil 21, no entanto essa foi caracterizada como não-STECC, mais uma evidência da variabilidade de *E. coli* excretadas por bovinos.

Cepas STECC e não-STECC isoladas de fezes de animais de raças diferentes, mas geneticamente indistinguíveis foram agrupadas no perfil 13, uma foi a cepa STECC do animal 3001 Angus ½ sangue e a outra foi a cepa não-STECC do animal Simental puro identificado como Boato, sendo que as duas cepas foram coletadas em dias distintos.

Os perfis 5, 6, 10, 13 e 16 nos permitem afirmar que existiu contaminação cruzada na criação e abate de bovinos deste estudo. Nos perfis 5, 13 e 16 encontramos cepas isoladas de amostras de fezes e de carcaça de animais de raças distintas, que demonstram a possível origem da contaminação das carcaças como sendo as fezes dos animais. Os perfis 6 e 10 nos mostram a contaminação entre

fezes, carcaças e água da baia, e entre fezes e água da baia, respectivamente. Estes dois perfis evidenciam que a contaminação dos animais e conseqüentemente das carcaças dos mesmos pode não ocorrer apenas pelo contato com as fezes de outros animais, mas que esta contaminação também pode ocorrer pelo consumo de água contaminada.

A cepa sorotipificada como O97:H1, *uidA*-positiva, proveniente de fezes do animal Angus puro 179, apresentou o mesmo perfil PFGE (P5) que a cepa O157:H7 isolada de amostra da superfície externa da carcaça do animal Nelore 852. Portanto, há relação genética bastante estreita entre estas cepas, ambas também apresentaram o mesmo genótipo (*ehxA*, *eaeA*, *stx<sub>2</sub>* e *uidA*).

As duas cepas STEC alocadas no perfil 20 foram isoladas da superfície interna da carcaça do animal Simental puro B621, uma antes da refrigeração e a outra após a refrigeração. Este fato é de grande importância, pois demonstra que a cepa permanece viável após o período de refrigeração de 24 h (para a segunda coleta da amostra de carcaça) e conseqüentemente pode chegar viável ao consumidor.

O perfil 7 demonstra que um mesmo animal (AP176) excreta cepas de *E. coli* de características diferentes, mas geneticamente indistinguíveis, ao longo do tempo. As duas cepas agrupadas neste perfil foram coletadas em datas diferentes, tendo sido uma identificada como STEC e sorotipificada como O178:H- e a outra, uma EPEC atípica O85:H7.

A disseminação de perfis indistinguíveis evidenciada pelos resultados aqui apresentados, é decorrente do tipo de criação (confinamento) utilizado, que acaba por favorecer a propagação e disseminação desses microrganismos. A disseminação também foi verificada por Bonardi *et al.* (2001) que pesquisaram a presença de STEC O157 em amostras de bovinos da Itália. A subtipificação empregando a PFGE sugere a existência de auto-contaminação do rebanho, pois cepas do mesmo perfil genético foram encontradas em animais de mesma baia/ lote. Além disso, cepas de mesmo perfil também foram identificadas nas carcaças desses animais e carcaças adjacentes, sugerindo assim a ocorrência de contaminação cruzada.

As cepas pertencentes aos perfis 15 e 29, embora provenientes de mesma placa, eram de colônias diferentes. No perfil 15 são três cepas O87:H25 provenientes da superfície externa da carcaça do animal Simental ½ sangue 74. Já

no outro perfil, são duas cepas provenientes de amostra de fezes do mesmo animal (Nelore 630), coletadas na mesma data e ambas positivas para o gene *stx*<sub>2</sub>, porém uma foi identificada como ONT:H7 e a outra OR:H7. Podemos supor que esta variação na identificação do antígeno O tenha ocorrido por alguma mutação em uma das cepas.

Para cinco das carcaças amostradas, as cepas de *E. coli* identificadas apresentaram perfil PFGE idêntico à cepas provenientes de amostras de fezes e/ou água da baía, porém não se pode afirmar a origem da contaminação dessas carcaças uma vez que as amostras foram coletadas em diferentes datas. Podemos apenas afirmar que cepas de *E. coli* geneticamente indistinguíveis encontraram-se disseminadas em diferentes amostras da criação de bovinos em estudo.

Arthur *et al.* (2007) avaliaram a contaminação por *E. coli* O157:H7 em bovinos antes e após o transporte até o abatedouro. Para avaliar a origem da contaminação das carcaças, as cepas O157:H7 das diferentes fontes foram avaliadas por PFGE e a maioria (69%) daquelas coletadas das carcaças não apresentou perfil PFGE relacionado aos perfis das cepas obtidas das fezes. Em 29% das cepas, o perfil PFGE foi relacionado ao perfil das cepas coletadas das fezes e nos 2% restantes, o perfil foi relacionado aos perfis encontrados nas amostras provenientes dos caminhões. Esses dados indicaram que a maior parte da contaminação encontrada apresentou origem desconhecida. Os autores acreditam que a fonte de contaminação possa ser o ambiente dos currais onde os animais permanecem após o transporte até o momento do abate.

A análise dos perfis obtidos empregando-se a enzima de restrição XbaI originou o dendrograma apresentado na Figura 07.

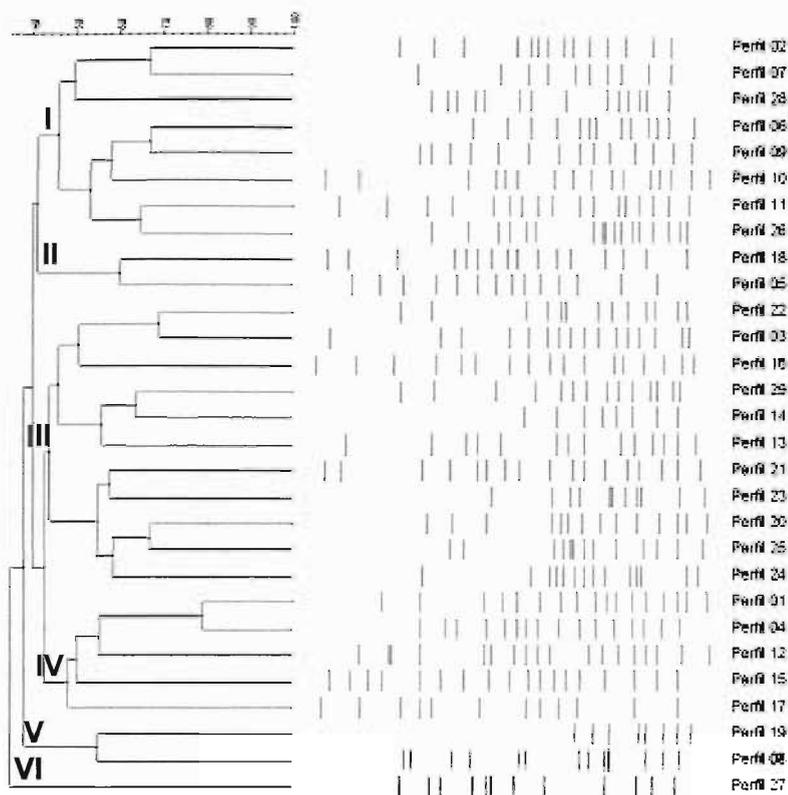


Figura 07 – Representação da relação genética entre os 29 perfis PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) obtidos com a enzima de restrição XbaI a partir de 66 cepas de *E. coli*. Consulte a Tabela 18 para identificação da origem das cepas.

Pela análise do dendrograma foi possível identificar seis *clusters*, sendo que o *cluster* III agrupou o maior número de perfis (11) e o VI o menor número (1). Com exceção dos perfis 1 e 4 que apresentaram similaridade de aproximadamente 80%, os demais perfis apresentaram similaridade entre si, sempre abaixo de 70%.

Os *clusters* II, V e VI alocaram perfis onde todas as cepas eram provenientes de amostras de fezes. No *cluster* I ficaram todos os perfis aos quais pertencem cepas provenientes de água, juntamente com perfis que continham cepas de fezes e carcaças. Nos demais *clusters* ficaram agrupados perfis cujas cepas eram de fezes e carcaças.

O único *cluster* que agrupou perfis em que todas as cepas foram caracterizadas como STEC foi o IV (13 cepas). Nos demais encontram-se cepas STEC, EPEC atípicas e cepas somente entero-hemolíticas.

As cepas sorotipificadas como O157:H7 e a cepa O97:H1 *uidA*-positiva foram agrupadas em três *clusters* diferentes (II, III e IV) e a similaridade entre eles ficou em aproximadamente 40%, ou seja, são cepas geneticamente distintas.

A cepa O97:H1 *uidA*-positiva e uma das cepas O157:H7 pertencem ao perfil 5, que juntamente com o perfil 18 fazem parte do *cluster* II. Ao perfil 18 pertencem cepas STEC e EPEC atípicas ONT:H8 e ONT:H7. Isto indica que a cepa O97:H1 *uidA*-positiva é geneticamente mais relacionada com as cepas pertencentes ao perfil 18 (ONT:H8 e ONT:H7) do que com as demais cepas do mesmo sorotipo (perfil 10, *cluster* I), além de ser indistinguível de uma cepa O157:H7.

No *cluster* III encontra-se outra cepa O157:H7 (perfil 3) que apresentou maior similaridade genética com outros dez perfis dos quais fazem parte tanto cepas STEC quanto EPEC atípicas e mesmo cepas entero-hemolíticas de diversos sorotipos/sorogrupos.

As demais cinco cepas O157:H7 (perfis 1 e 4) foram agrupadas no *cluster* IV onde todas as cepas são STEC.

As cepas O157:H7 alocadas em perfis PFGE distintos demonstram que, apesar de pertencerem ao mesmo sorotipo, apresentam diferentes origens clonais. Elas ainda localizaram-se em diferentes *clusters* mostrando maior similaridade com outras STEC ou até mesmo com EPEC atípicas e cepas apenas entero-hemolíticas.

Resultados diferentes aos aqui apresentados são relatados por Vaz *et al.* (2006), que analisaram por PFGE cepas de *E. coli* isoladas do Estado de São Paulo entre 1976 e 2003. Os autores evidenciaram que todas as cepas O157:H7 (quatro proveniente de amostras clínicas, uma de bovino e uma de água) ficaram agrupadas em um mesmo *cluster*. Entretanto, a avaliação por PFGE foi executada através da construção de dendrogramas distintos para cada sorogrupo, ou seja, a comparação foi somente entre sorogrupos (O157, O26 e O111). Dessa maneira não há como saber se as cepas O157:H7 permaneceriam no mesmo *cluster* caso o dendrograma tivesse sido construído com todas as cepas, como foi em nosso trabalho.

Neste estudo alguns perfis PFGE (P6, P7, P10, P13, P18, P19 e P21) agruparam cepas STEC, EPEC atípicas e cepas entero-hemolíticas, assim como cepas pertencentes a diferentes sorogrupos, ou seja, tais cepas, apesar dessas diferenças, são consideradas geneticamente indistinguíveis. Por esse motivo, optou-se pela construção do dendrograma com todas as cepas de *E. coli* avaliadas por

PFGE para, desta forma, evidenciar a similaridade entre perfis genéticos de cepas consideradas diferentes.

Apesar de não ter sido possível traçar a origem da contaminação das carcaças bovinas, a PFGE apresentou resultados de grande importância, uma vez que demonstrou a disseminação e a permanência de cepas STEC na criação de bovinos pesquisada. Além disso, indicou que existem origens clonais distintas entre cepas de mesma categoria (STEC, EPEC atípica e cepas entero-hemolíticas) e mesmo sorogrupo.

Nas Tabelas 20 e 21 estão sumarizados todos os resultados obtidos neste estudo para as 66 cepas de *E. coli* avaliadas.

Dentre as amostras ambientais, coletadas antes da entrada dos animais no galpão de confinamento, nenhuma apresentou contaminação por STEC, EPEC atípica ou mesmo *E. coli* positiva para algum possível marcador de virulência (entero-hemolíticas). Esse resultado demonstra que o ambiente estava livre de contaminação antes dos animais chegarem.

O mesmo resultado foi observado para o monitoramento das amostras de ração e seus componentes, evidenciando que essas não são fontes de contaminação dos animais. Por outro lado, cepas STEC e/ou EPEC atípicas foram identificadas entre os isolados provenientes de amostras de fezes e carcaças dos bovinos e de água da baía.

Das amostras de fezes coletadas do conjunto dos animais de cada raça, apenas nas fezes proveniente das raças Angus puro e Simental puro foram detectadas cepas STEC, sendo que das fezes do conjunto dos animais Angus puro detectou-se STEC O157:H7 (Tabela 20). Essa detecção demonstra que alguns animais, originários de diferentes regiões e propriedades, já chegaram ao confinamento excretando o microrganismo em suas fezes, possibilitando assim a disseminação desse durante toda a fase de confinamento e do abate.

Já quando se fez a avaliação de fezes individuais verificou-se que em todas as raças de bovinos avaliadas neste estudo (Nelore, Simental, Angus, Angus ½ sangue e Simental ½ sangue) foram detectadas cepas STEC. Todos os 12 animais da raça Angus puro avaliados, eram portadores de STEC em suas fezes. Dentre as demais raças, cinco animais (41,7%) da raça Simental ½ sangue, quatro (33,3%) da raça

Angus ½ sangue, um bovino (8,3%) da raça Simental puro e um outro (8,3%) da raça Nelore apresentaram-se contaminados com cepas de STEC. Assim, do total de 60 animais avaliados, 38,3% (23) foram positivos para a presença de STEC em suas fezes.

EPEC atípicas foram encontradas apenas em três animais (25%) da raça Angus puro e em um animal (8,3%) da raça Angus ½ sangue, ou seja, do total dos 60 animais, 4 (6,7%) apresentaram contaminação por esse grupo de microrganismos em suas fezes. Já cepas de *E. coli* entero-hemolíticas, foram encontradas em três animais (25%) da raça Simental puro, em dois bovinos (16,7%) da raça Angus puro e em um animal (8,3%) da raça Nelore, representando 10% (6) do total de animais.

É importante destacar que os animais da raça Nelore, que correspondem à maior proporção dos animais abatidos em nosso país, foram os que apresentaram menor positividade para STEC, EPEC atípicas ou mesmo para *E. coli* entero-hemolíticas. Isto explica o porquê da baixa detecção de STEC em produtos cárneos em nosso país. Silveira *et al.* (1999) avaliaram 886 amostras de hambúrgueres produzidos no sul e sudeste do Brasil para a presença de *E. coli* O157:H7. Nenhuma das amostras mostrou-se contaminada com esse microrganismo, assim como também não foram identificadas STEC não-O157.

Em Ribeirão Preto e Campinas, Bergamini *et al.* (2007) avaliaram a presença de STEC em amostras de carne e verificaram que das amostras de Ribeirão Preto, 3,5% foram positivas para STEC enquanto nenhuma das amostras coletadas em Campinas apresentou contaminação.

Na pesquisa de Rodolpho e Marin (2007), em Taquaritinga (SP), de um total de 287 isolados provenientes de amostras de carne bovina, de moedor de carne e das mãos de manipuladores de açougues, somente quatro (1,4%) foram confirmados como STEC. Dessas quatro cepas, apenas duas (0,7%) eram provenientes de amostras de carne bovina.

Tabela 20 – Cepas de *E. coli* não fermentadoras de sorbitol avaliadas neste experimento.

Identificação	Origem	Data da coleta	Eh <sup>1</sup>	Presença dos genes (PCR)				Variantes de stx			Stx (Duopath®)	Citotoxici- cidade (CV)	Variantes de eaeA	Sorotipo/ sorogrupo	Perfil PFGE
				ehxA	eaeA	stx <sub>1</sub>	stx <sub>2</sub>	uidA	stx <sub>1</sub>	stx <sub>2</sub>					
001 - <sup>2</sup>	Fezes AP <sup>3</sup>	15/07/02	+	+	+	+	+	-	-	stx <sub>2dat</sub>	Stx2	+	eae-γ	O157:H7	1
005 -	Fezes SP <sup>4</sup>	15/07/02	-	-	-	-	-	-	-	stx <sub>2dat</sub>	Stx2	+	-	O172:H-	2
008 -	Fezes AP176	22/08/02	+	+	+	+	+	-	-	stx <sub>2dat</sub>	-	+	-	O157:H7	3
022 -	Fezes AP 155	25/09/02	+	+	+	+	+	-	-	stx <sub>2ci</sub> stx <sub>2dat</sub>	Stx2	+	eae-γ	O157:H7	4
023 -	Fezes AP 161	25/09/02	+	+	-	+	+	-	-	stx <sub>2dat</sub>	Stx2	+	eae-γ	O157:H7	1
024 -	Fezes AP179	25/09/02	+	+	-	+	+	-	-	stx <sub>2dat</sub>	-	+	eae-γ	O97:H1	5
040 -	Fezes AP 155	13/11/02	+	+	-	+	+	-	-	stx <sub>2ci</sub> stx <sub>2dat</sub>	Stx2	+	eae-γ	O157:H7	1
041 -	Fezes AP176	13/11/02	+	+	-	+	+	-	-	stx <sub>2ci</sub> stx <sub>2dat</sub>	Stx2	+	eae-γ	O157:H7	4
049 -	Fezes AP176	14/12/02	-	-	+	-	-	-	stx <sub>1c</sub>	-	Stx1	+	-	O38:H21	6
063 -	Fezes AP176	14/12/02	-	-	+	-	-	-	stx <sub>1c</sub>	-	Stx1	+	-	O38:H21	6
064 -	Fezes AP176	14/12/02	-	-	+	-	-	-	stx <sub>1c</sub>	-	Stx1	+	-	O38:H21	6
073 -	Fezes AP176	14/12/02	+	+	-	+	+	-	stx <sub>1c</sub> stx <sub>2dat</sub>	stx <sub>2ci</sub>	Stx1; Stx2	+	-	O178:H-	7
090 -	Fezes AP176	14/12/02	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	ONT:HNT	8
138 -	Fezes AP176	17/02/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H8	9
142 -	Fezes AP176	17/02/03	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O85:H7	7
151 -	Água B15 <sup>5</sup>	17/02/03	-	+	-	-	-	-	-	stx <sub>2e</sub>	-	-	-	O97:H1	10
153 -	Água B15	17/02/03	-	+	-	-	-	-	-	stx <sub>2e</sub>	-	-	-	O97:H1	10
169 -	Água B15	17/02/03	-	+	-	-	-	-	-	stx <sub>2e</sub>	-	-	-	O97:H1	10
170 -	Água B15	17/02/03	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:HNT	6

Cont.



Tabela 21 – Cepas de *E. coli* fermentadoras de sorbitol avaliadas neste experimento.

Identificação	Origem	Data da coleta	Eh <sup>1</sup>	Presença dos genes (PCR)				Variantes de stx			Stx (Duopath®)	Citotoxi-cidade (CV)	Variantes de eaeA	Sorotipo/sorogrupo	Perfil PFGE
				ehxA	eaeA	stx <sub>1</sub>	stx <sub>2</sub>	uidA	stx <sub>1</sub>	stx <sub>1c</sub>					
005 + <sup>2</sup>	Fezes A 1/2 3007	25/09/02	-	+	-	+	-	-	stx <sub>1c</sub>	-	Stx1	+	-	O136:H16	6
006 +	Fezes A 1/2 3007	25/09/02	-	+	-	+	-	-	stx <sub>1c</sub>	-	Stx1	+	-	O136:H16	6
032 +	Fezes AP <sup>4</sup> 161	25/09/02	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	ONT:H16	4
079 +	Fezes AP 183	13/11/02	-	-	-	+	-	-	-	-	Stx1	+	-	ONT:H7	23
089 +	Fezes S <sup>1/2</sup> 65	13/11/02	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H2	24
092 +	Fezes S <sup>1/2</sup> 67	13/11/02	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H8	25
093 +	Fezes S <sup>1/2</sup> 68	13/11/02	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H31	26
119 +	Fezes AP s/n° 1	14/12/02	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ONT:H34	21
128 +	Fezes AP s/n° 3	14/12/02	-	-	-	-	+	-	-	stx <sub>2c</sub>	-	-	-	ONT:H21	12
131 +	Fezes AP s/n° 3	14/12/02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O157:H12	21
132 +	Fezes AP 158	14/12/02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O157:H12	21
151 +	Fezes N <sup>6</sup> 630	14/12/02	-	-	-	-	+	-	-	stx <sub>2f</sub>	-	-	-	ONT:H7	29
153 +	Fezes N 630	14/12/02	-	-	-	-	+	-	-	stx <sub>2f</sub>	-	-	-	OR:H7	29
156 +	Fezes N 687	14/12/02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H21	22
170 +	Fezes A 1/2 3001	14/01/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	OR:H30	13
172 +	Fezes A 1/2 3002	14/01/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H8	14
186 +	Fezes A 1/2 3012	14/01/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	ONT:H7	17
189 +	Fezes A 1/2 3017	14/01/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	ONT:H7	17
203 +	Fezes AP s/n° 1	17/02/03	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ONT:H8	18
204 +	Fezes AP s/n° 1	17/02/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	O85:H7	19
264 +	Fezes AP 153	10/03/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H8	18

Cont.

Cont. Tabela 21

266 +	Fezes AP 155	10/03/03	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H2	28
267 +	Fezes AP 161	10/03/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H8	18
271 +	Fezes AP 158	10/03/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H7	18
272 +	Fezes AP 152	10/03/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O102:H21	27
274 +	Fezes AP 164	10/03/03	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O79:H14	16
276 +	Fezes AP 177	10/03/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O85:H7	19
277 +	Fezes AP 178	10/03/03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O85:H7	19
285 +	Carçaça S½ 68 ER <sup>7</sup>	18/11/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H21	16
288 +	Carçaça S½ 72 I <sup>8</sup>	18/11/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H34	13
299 +	Carçaça S½ 68 IR <sup>9</sup>	18/11/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O152:H16	6
302 +	Carçaça S½ 74 E <sup>10</sup>	18/11/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O87:H25	15
303 +	Carçaça S½ 74 E	18/11/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O87:H25	15
306 +	Carçaça S½ 74 E	18/11/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O87:H25	15
347 +	Fezes S½ 75	25/09/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H10	11
348 +	Fezes S½ 76	25/09/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H46	12
369 +	Fezes SP <sup>11</sup> B41	25/09/02	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H21	10
376 +	Fezes SP 362	25/09/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H10	11
378 +	Fezes SP Belo	25/09/02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ONT:H21	10
381 +	Fezes SP Boato	25/09/02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OR:HR	13

<sup>1</sup>Atividade Entero-hemolítica; <sup>2</sup>Cepas Sorbitol Positivo; <sup>3</sup>Raça Angus ½ Sangue; <sup>4</sup>Raça Angus Puro; <sup>5</sup>Raça Simental ½ Sangue; <sup>6</sup>Raça Nelore; <sup>7</sup>Carçaça Superfície Externa Refrigerada; <sup>8</sup>Carçaça Superfície Interna Refrigerada; <sup>9</sup>Carçaça Superfície Interna Refrigerada; <sup>10</sup>Carçaça Superfície Externa; <sup>11</sup>Raça Simental Puro

Dentre as amostras proveniente das carcaças dos animais pertencentes às mesmas raças, STEC foi encontrada nas carcaças de animais das raças Simental puro, Simental ½ sangue e Nelore, não sendo detectada nas demais raças. Esses resultados ressaltam a utilização, por parte do frigorífico avaliado, e a importância das boas práticas de produção na prevenção da contaminação das carcaças com cepas STEC.

Considerando o total de 120 amostras de superfícies de carcaças que foram coletadas antes da refrigeração [60 animais x 2 (superfície interna e externa)]. Destas, apenas 4 (3,3%) apresentaram-se contaminadas com cepas STEC, sendo duas amostras provenientes de superfície interna das carcaças de um animal Simental ½ sangue (S ½ 72) e da raça Simental puro (SP B621). As outras duas amostras eram da superfície externa de um animal Simental ½ sangue (S ½ 74) e da carcaça de um animal Nelore (N 852).

Após a refrigeração das carcaças, também foram coletadas 120 amostras e destas, apenas 3 (2,5%) apresentaram-se contaminadas com cepas STEC. Uma destas amostras foi obtida da superfície interna da carcaça de um animal Simental puro (SP B621), o mesmo que havia apresentado contaminação da superfície interna da carcaça antes da refrigeração. Estas duas cepas STEC (provenientes da superfície interna da carcaça antes e após a refrigeração) apresentaram os mesmos perfis de genes e PFGE e também o mesmo sorotipo (O177:H-), fato que demonstra a capacidade de cepas STEC permanecerem viáveis após a refrigeração. Outro fato importante é que não houve detecção de *E. coli* nas amostras de fezes desse animal, com isso, pode-se considerar que a contaminação da carcaça ocorreu, provavelmente, por contaminação cruzada, mas que provavelmente o extravasamento do conteúdo intestinal desse animal não é a origem dessa contaminação.

As outras duas cepas STEC obtidas de carcaças refrigeradas foram proveniente de um único animal da raça Simental ½ sangue (S ½ 68), porém uma foi da superfície interna e outra da superfície externa. Este mesmo animal havia apresentado resultado positivo para a presença de STEC em amostra de suas fezes (cepa 093+) (Tabela 21). As cepas provenientes destas amostras (fezes e carcaças) apresentaram sorotipos e perfis PFGE distintos, porém as três eram positivas apenas para a presença do gene *stx*<sub>1</sub>. Esses dados indicam que o animal abrigava uma variedade de STEC e sua carcaça apresentou outras duas variedades de STEC

distintas da primeira, portanto as fezes não podem ser incriminadas como origem da contaminação da carcaça.

Além da baixa ocorrência de STEC nas amostras de carcaça, nenhuma cepa EPEC atípica foi encontrada nestas amostras. Dentre as *E. coli* entero-hemolíticas, encontrou-se uma cepa (261-) proveniente da superfície interna da carcaça de um animal da raça Nelore (N 513) (Tabela 20) positiva para a presença do gene *ehxA* e para a produção de entero-hemolisina.

Somente a amostra de água proveniente da baía 15 (10%), de um total de dez baias amostradas do galpão de confinamento, apresentou contaminação por STEC. Uma das cepas identificadas nessa amostra apresentou o mesmo perfil PFGE (P6) que a cepa proveniente de amostra da superfície interna refrigerada da carcaça do animal Simental ½ sangue 68, o qual estava confinado nesta baía. A hipótese que pode ser levantada, é que esse animal poderia estar excretando esta cepa na época em que foi feita a coleta da água, mas que por limitações da metodologia não houve a detecção e isso demonstraria que a contaminação da água foi proveniente das fezes/saliva dos animais, já que não foi detectada contaminação nas amostras da caixa d'água abastecedora.

Das amostras de utensílios, equipamentos e ambiente coletadas no frigorífico, não foram identificadas cepas STEC ou mesmo de *E. coli* positivas para algum possível marcador de patogenicidade. Portanto, mais uma vez destacamos a utilização e importância das boas práticas de produção, uma vez que a contaminação das carcaças positivas para STEC não tem origem nessas amostras do frigorífico.

Importante ressaltar que dentre as 50 cepas STEC encontradas neste estudo, nove (19,1%) apresentaram o gene *eaeA*. Estas cepas eram provenientes de amostras de fezes do conjunto de animais Angus puro (cepa 001-) e de cinco animais dessa mesma raça (cepas 008-, 022-, 023-, 024-, 040-, 041-, 185-), além da amostra de superfície de carcaça de animal Nelore (cepa 274-) (Tabela 20). Sete dessas cepas são do sorotipo O157:H7, uma é O97:H1 e a outra O79:H14. A importância da detecção dessas cepas está no fato de se saber que cepas LEE-positivas estão envolvidas em casos mais severos de infecções provocadas por *E. coli* (Caprioli *et al.*, 2005; Spears *et al.*, 2006). Por esse motivo salienta-se que tais cepas, principalmente aquela isolada de amostra de carcaça, são potenciais riscos à

saúde pública, uma vez que podem contaminar o produto final. Outro dado interessante é que as oito cepas que apresentaram variantes de intimina pertenciam a este sub-grupo de STEC.

Os resultados desta pesquisa são de grande importância sob vários aspectos. O primeiro deles, é que sem dúvida alguma as fezes de bovinos são potenciais fontes de contaminação dos animais criados em confinamento, das carcaças e outros alimentos por STEC.

Outro aspecto merece destaque: em nosso país, a contaminação das carcaças por cepas STEC é baixa, e cepas STEC não-O157 são mais frequentemente isoladas de bovinos de corte criados em confinamento que cepas O157, indicando que O157:H7 ainda não é um grande problema para a indústria de carnes.

Um terceiro aspecto é a baixa ocorrência de sorogrupos STEC reconhecidamente causadores de infecções mais graves em humanos o que explica a baixa frequência dessas infecções no Brasil, apesar das limitações existentes com relação a dados epidemiológicos de doenças de origem alimentar.

Embora os resultados aqui apresentados sejam de grande importância e bastante esclarecedores, ainda existem pontos que precisam ser elucidados como, por exemplo, a relação entre a cepa O97:H1 *uidA*-positiva e as cepas O157:H7. Também seria interessante esclarecer quais as toxinas produzidas pelas cepas que apresentaram citotoxicidade em células Vero, mas que não apresentaram *stx*. Outro ponto, que exigiria um trabalho mais longo e detalhado, é tentar identificar se há relação entre a raça Angus e a maior frequência de isolamento de STEC. Além disso, a influência do ambiente pré-abate na disseminação da contaminação entre os animais de mesmo curral e a contaminação do couro na qualidade microbiológica das carcaças também merecem atenção.

## 5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados e discussões aqui apresentados, pode-se concluir que:

- Os bovinos criados em sistema de confinamento são importantes reservatórios e veículos de disseminação de STEC;
- A frequência de contaminação das fezes dos animais por STEC varia com a raça, e o mesmo ocorre com as carcaças;
- O ambiente de confinamento e do abatedouro, assim como a água e ração utilizadas na criação não são as principais vias de disseminação de STEC;
- Enquanto a produção de entero-hemolisina e presença de *ehxA* não foram marcadores eficientes na pesquisa de STEC, o gene *uidA* demonstrou ser um ótimo marcador na pesquisa do sorotipo O157:H7;
- Existe uma maior ocorrência, dentre os animais avaliados, de cepas STEC não-O157;
- Dentre a variedade de sorogrupos/sorotipos encontrados, cepas O157:H7 foram identificadas de amostras de fezes e pela primeira vez no Brasil, de amostra de carcaça de bovino criado em confinamento. Observou-se ainda que nenhum outro sorogrupo, relacionado a surtos e casos esporádicos de doença causada por STEC, foi detectado;
- A detecção de cepas STEC em amostras de fezes e, principalmente em amostras de carcaças de bovinos, evidencia o potencial risco à saúde dos consumidores, uma vez que essas cepas podem contaminar o produto final.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; de CASTRO, A.F.P. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.297-306, 2007.

ALAM, M.J.; ZUREK, L. Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle feces. **Journal of Food Protection**, v.69, n.12, p.3018-3020, 2006.

ALDICK, T.; BIELAZEWSKA, M.; ZHANG, W.; BROCKMEYER, J.; SCHMIDT, H.; FRIEDRICH, A.W.; KIM, K.S.; SCHMIDT, M.A.; KARCH, H. Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. **Microbes and Infection**, v.9, p.282-290, 2007.

ALONSO, E.P.C.; GILLILAND, S.E.; KREHBIEL, C.R. Incidence and toxin production ability of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from cattle trucks. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p.2383-2385, 2007.

ARTHUR, T.M.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; RIVERA-BETANCOURT, M.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.10, p.4847-4852, 2002.

ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.J.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; GUERINI, M.N.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. **Journal of Food Protection**, v.70, n.2, p.280-286, 2007.

AVERY, S.M.; LIEBANA, E.; HUTCHISON, M.L.; BUNCIC, S. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meat and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.161-169, 2004.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, T.M.; RIVERRA-BETANCOURT, M.; NOU, X.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.1978-1986, 2003.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, T.M.; RIVERA-BETANCOURT, M.; NOU, X.W.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Characterization of O157:H7 and other *Escherichia coli* isolates recovered from cattle hides, feces, and carcasses. **Journal of Food Protection**, v.67, p.993-998, 2004.

BASTOS, F.C.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; GUTH, B.E.C. Phenotypic characterization, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. **FEMS Microbiology Letters**, v.265, p.89-97, 2006.

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

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.553-556, 2007.

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

BETTELHEIM, K.A.; KUZEVSKI, A.; GILBERT, R.A.; KRAUSE, D.O.; McSWEENEY, C.S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.699-709, 2005.

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

BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Medical Microbiology and Immunology**, v.180, p.167-182, 1991.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; ALEKSIC, S.; GILLESPIE, H.A.; WHITTAM, T.S. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxin in separate populations of cattle and sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2175-2180, 1997.

BEUTIN, L.; MIKO, A.; KRAUSE, G.; PRIES, K.; HABY, S.; STEEGE, K.; ALBRECHT, N. Identification of human pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.15, p.4769-4775, 2007.

BHAKDI, I.S.; MACKMAN, N.; NICAUD, J.M.; HOLLAND, I.B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. **Infection and Immunity**, v.52, n.1, p.63-69, 1986.

BIELASZEWSKA, M.; SINHA, B.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Cytotoxic distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.552-562, 2005.

BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, W.; ALDICK, T.; SCHÜRK-BULGRIN, R.; KARCH, H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.1160-1167, 2006.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M.P.; MOURINO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.309-319, 1997.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1351-1356, 2003.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.2, p.645-651, 2004a.

BLANCO, M.; PADOLA, N.L.; KRÜGER, A.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ, E.A.; DAHBI, G.; MORA, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; ETCHEVERRÍA, A.I.; ARROYO, G.H.; LUCCHESI, P.M.A.; PARMA, A.E.; BLANCO, J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. **International Microbiology**, v.7, p.269-276, 2004b.

BLANCO, M.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-η2*). **BMC Microbiology**, v.5, p.23-33, 2005.

BOERLIN, P. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 56, p.735-741, 1999.

BONARDI, S.; MAGGI, E.; PIZZIN, G.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A. Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.66, p.47-53, 2001.

BOPP, C.A; BRENNER, F.W; WELLS, J.G; STROCKBINE, N. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 9ª ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003. Cap. 28, p 459-474.

BOSILEVAC, J.M.; ARTHUR, T.M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J.O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.646-650, 2004.

BOUVET, J.; BAVAI, C.; ROSSEL, R.; Le ROUX, A.; MONTET, M.P.; RAYGUENIOT, S.; MAZUY, C.; ARQUILLIERE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.249-255, 2001.

BRETT, K.N.; HORNITZKY, M.A.; BETTELHEIM, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx*<sub>2-EDL933</sub> and/or *stx*<sub>2vhb</sub> subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.6, p.2716-2722, 2003a.

BRETT, K.N.; RAMACHANDRAN, V.; HORNITZKY, M.A.; BETTELHEIM, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. *stx*<sub>1c</sub> is the most common Shiga toxin subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.926-936, 2003b.

BROOKS, J.T.; SOWERS, E.G.; WELLS, J.G.; GREENE, K.D.; GRIFFIN, P.M.; HOEKSTRA, R.M.; STROCKBINE, N.A. Non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.192, p.1983-2002, 2005.

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; AÇAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M.; MÄRTLBAUER, E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.5, p.2106-2112, 2003.

CAMPOS, L.; TRABULSI, L. *Escherichia*. In: TRABULSI, R.T., ALERTHUM, F., CANDEIAS, J.N., GOMPETZ, O.F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 28, p.215-228.

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

Centers for disease control. (2000). One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: \_\_\_\_\_. PulseNet: The national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control. Section, 5(11), 1-14.

CEBULA, T.A.; PAYNE, W.L.; FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 248-250, 1995.

CERGOLE-NOVELLA, M.; NISHIMURA, L.S.; IRINO, K.; VAZ, T.M.; CASTRO, A.F.P.; LEOMIL, L.; GUTH, B.E. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v.259, p.234-239, 2006.

CERQUEIRA, A.; TIBANA, A.; GUTH, B. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.60, p.177-180, 1997.

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

CHAHED, A.; CHINA, B.; MAINIL, J.; DAUBE, G. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.361-368, 2006.

CHART, H.; JENKINS, C.; SMITH, H.R.; HEDGES, D.; ROWE, B. Haemolysin production by strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.144, p.103-107, 1998.

CHILDS, K.D.; SIMPSON, C.A.; WARREN-SERNA, W.; BELLENGER, G.; CENTRELLA, A.; BOWLING, R.A.; RUBY, J.; STEFANEK, J.; VOTE, D.J.; CHOAT, T.; SCANGA, J.A.; SOFOS, J.N.; SMITH, G.C.; BELK, K.E. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 hide contamination routes: feedlot to harvest. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1240-1247, 2006.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.249-259, 1998.

CONNER, D.E.; KOTROLA, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Acidic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.382-385, 1995.

COOMBES, B.K.; WICKHAM, M.E.; MASCARENHAS, M.; GRUENHEID, S.; FINALY, B.B.; KARMALI, M.A. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.07, p.2153-2160, 2008.

De TONI, F.; SOUZA, E.M. de; KLASSEN, G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, C.R. da; PICHETH, G.; FARAH, S.M.S.S.; FADEL-PICHETH, C.M.T. Detecção de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.36, n.2, p.73-77, 2004.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, p.297-302, 1945.

DIEZ-GONZALEZ, F.; RUSSEL, J.B. Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v.16, p.367-374, 1999.

DINEEN, S.S.; TAKEUCHI, K.; SOUDAH, J.E.; BOOR, K.J. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. **Journal of Food Protection**, v.61, n.12, p.1602-1608, 1998.

DJORDJEVIC, S.P.; HORNITZKY, M.A.; BAILEY, G.; GILL, P.; VANSELOW, B.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K.A. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.5, p.2017-2021, 2001.

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

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 539-548, 2001.

DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157H:7. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, R. L.; MONTEVILLE, T. J. **Food Microbiology**. 1<sup>a</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology, 1997. Cap. 10, p 171-191.

EDWARDS, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 4ed. New York: Elsevier Science, 1986, 362p.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v.97, n.7, p.2999-3003, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa – Gado de Corte: Engorda de bovinos em confinamento – Aspectos gerais**. Disponível em <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc64/index.html>. Acesso em: 06 agosto 2008.

ERICKSON, M.C.; DOYLE, M.P. Food as vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p.2426-2449, 2007.

FARAH, S.M.S.S.; de SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; IRINO, K.; da SILVA, L.R.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; PIGATTO, C.P.; FADEL-PICHETH, C.M.T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.607-612, 2007.

FARBER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation. In: **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association (APHA), 2001. Chap. 11, p.127-158.

FEGAN, N.; VANDERLINDE, P.; HIGGS, G.; DESMARCHELIER, P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.362-370, 2004.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W.H. International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, v.85, n.5, p.1187-1200, 2002.

FENG, P., MONDAY, S.R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p.333-337, 2000.

FENG, P.; SANDLIN, R.C.; PARK, C.H.; WILSON, R.A.; NISHIBUCHI, M. Identification of a rough strain of *Escherichia coli* O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.8, p.2339-2341, 1998.

FITZHENRY, R.J.; PICKARD, D.J.; HARTLAND, E.L.; REECE, S.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Gut**, v.50, p.180-185, 2002.

FRANKE, S.; HARMSSEN, D.; CAPRIOLI, A.; PIERARD, D.; WIELER, L.H.; KARCH, H. Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p.3174-3178, 1995.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J.B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, n.5, p.911-921, 1998.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; TRABULSI, L. R.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G.; MATTHEWS, S. Intimin and the host cell- is it bound to end in Tir(s)? **TRENDS in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 214-218, 2001.

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

FUKUSHIMA, H.; HASHIZUME, T.; MORITA, Y.; TANAKA, J.; AZUMA, K.; MIZUMOTO, Y.; KANENO, M.; MATSU-URA, M-O.; KONMA, K.; KITANI, T. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. **Pediatrics International**, v.41, p.213-217, 1999.

GARCIA-ALJARO, C.; MUNIESA, M.; JOFRE, J.; BLANCH, A.R. Newly identified bacteriophages carrying the stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, p.127-135, 2006.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new toll for typing genetic variants of LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. **Clinical Chemistry**, v.52, n.2, p.192-201, 2006.

GENTRY, M.K.; DALRYMPLE, J.M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. **Journal Clinical Microbiology**, v.12, p. 361-366, 1980.

GUN, H.; YILMAZ, A.; TURKER, S.; TANLASI, A.; YILMAZ, H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.339-344, 2003.

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 toxinproducing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.8, p.1085-1089, 2002a.

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

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

GUNZER, F.; BOHM, H.; RUSSMANN, H.; BITZAN, M.; ALEKSIC, S.; KARCHI, H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.07, p.1807-1810, 1992.

HAYES, P.S.; BLOMK, K.; FENG, P.; LEWIS, J.; STROCKBINE, N.A.; SWANINATHAN, B. Isolation and characterization of a beta-D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p.3347-3348, 1995.

HAZARIKA, R.A.; SINGH, D.K.; KAPOOR, K.N.; AGARWAL, R.K.; PANDEY, A.B.; RAJKUMAR, D.N. Detection and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from buffalo meat. **Journal of Food Safety**, v.24, p.281-290, 2004.

HOEY, D.E.; CURRIE, C.; ELSE, R.W.; NUTIKKA, A.; LINGWOOD, C.A.; GALLY, D.L.; SMITH, D.G.E. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. **Journal of Medical Microbiology**, v.51, p.143-149, 2002.

HOEY, D.E.; SHARP, L.; CURRIE, C.; LINGWOOD, C.A.; GALLY, D.L.; SMITH, D.G.E. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. **Cellular Microbiology**, v.5, n.2, p.85-97, 2003.

HOLT, J.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 Ed. Baltimore: The Willians e Wilkins Co, 1994, 751p.

HORNITZKY, M.A.; VANSELOW, B.A.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K.A.; CORNEY, B.; GILL, P.; BAILEY, G.; DJORDJEVIC, S.P. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6439-6445, 2002.

HUNTER, S.B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M.A.; DUYNE, S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T.; RIBOT, E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1045-1050, 2005.

IKEDA, K.; IDA, O.; KIMOTO, K.; TAKATORIGE, T.; NAKANISHI, N.; TATARA, K. Effect of early fosfomicin treatment on prevention of hemolytic-uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Clinical Nephrology**, v.52, p.357-362, 1999.

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

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. **Veterinary Microbiology**, v.105, p. 29-36, 2005.

JELACIC, J.K.; DAMROW, T.; CHEN, G.S.; JELACIC, S.; BIELASZEWSKA, M.; CIOL, M.; CARVALHO, H.M.; MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN, A.D.; TARR, P.I. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p.719-729, 2003.

JEONG, K.C.; KANG, M.Y.; HEIMKE, C.; SHERE, J.A.; EROL, I.; KASPAR, C.W. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n.2-4, p.339-345, 2007.

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

JINNEMAN, K.C.; WEAGANT, S.D.; JOHNSON, J.M.; ABBOTT, S.L.; HILL, W.E.; TENGE, B.J.; DANG, N.L.; RAMSDEN, R.; OMIECINSKI, C.J. A large insertion in the Shiga-like toxin 2 gene (stx2) of an *Escherichia coli* O157:H7 clinical isolate. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.115-124, 2000.

JO, M-Y.; KIM, J-H.; LIM, J-H.; KANG, M-Y.; KOH, H-B.; PARK, D-Y.; CHAE, J-S.; EO, S-K.; LEE, J.H. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.41-49, 2004.

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*. **Journal of Food Protection**, v.59, n.10, p.1112-1122, 1996.

JOHNSON, W.M.; POLLARD, D.R.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K.R. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (Vte) by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.10, p.2351-2353, 1990.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews – Microbiology**, v.2, p.123-138, 2004.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; CHEUNG, R.; ARBUS, G.S. Sensitive methods for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.4, p.614-619, 1985.

KARMALI, M.V. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p.15-38, 1989.

KAUFMANN, M.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v.69, n.2, p.260-266, 2006.

KAWANO, K.; OKADA, M.; HAGA, T.; MAEDA, K.; GOTO, Y. Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.27, p.227-232, 2008.

KOBAYASHI, H.; MIURA, A.; HAYASHI, H.; OGAWA, T.; ENDO, T.; HATA, E.; EGUCHI, M.; YAMAMOTO, M. Prevalence and characteristics of *eae*-positive *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.9, p.5690-5692, 2003.

KOITABASHI, T.; VUDDHAKUL, V.; RADU, S.; MORIGAKI, T.; ASAI, N.; NAKAGUCHI, Y.; NISHIBUCHI, M. Genetic characterization of *Escherichia coli* O157:H7/- strains carrying the *stx*<sub>2</sub> gene but not producing Shiga toxin 2. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.2, p.135-148, 2006.

KOKAI-KUN, J.F.; MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN, A.D. Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d\*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.5, p.3713-3721, 2000.

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

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.

KUMAR, H.S.; KARUNASAGAR, I.; TEIZOU, T.; SHIMA, K.; YAMASAKI, S. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. **FEMS Microbiology Letters**, v.233, p.173-178, 2004.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.729-745, 2000.

LeJEUNE, J.T.; HANCOCK, D.; WASTESON, Y.; SKJERVE, E.; URDAHL, A.M. Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p.19-24, 2006.

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

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

LUCK, S.N.; BENNETT-WOOD, V.; POON, R.; ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.73, n.5, p.3063-3071, 2005.

MAINIL, J.G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who?. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1332-1344, 2005.

MATTICKA, K.; DURHAMA, K.; DOMINGUEA, G.; JORGENSENA, F.; SEN, M.; SCHAFFNERC, D.W.; HUMPHERYD, T. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.213-226, 2003.

MAURER, C.; LAZIZZERA, C.; MADEC, J.Y. Characterization of inducible *stx*<sub>2</sub>-positive *Escherichia coli* O157:H7/H- strains isolated from cattle in France. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1569-1576, 2008.

McEVOY, J.M.; DOHERTY, A.M.; SHERIDAN, J.J.; THOMSON-CARTER, F.M.; GARVEY, P.; McGUIRE, L.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.256-266, 2003.

MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, v.352, p.1207-1212, 1998.

MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRÉ, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLEMI, G.; GUTH, B.E.C.; MASANA, M.O.; CATALDI, A.; RODRIGUEZ, H.R.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.189-198, 2004.

MELLMANN, A.; LU, S.; KARCH, H.; XU, J.; HARMSSEN, D.; SCHMIDT, M.A.; BIELASZEWSKA, M. Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.01, p.67-72, 2008.

MELTON-CELSA, A.R.; DARNELL, S.C.; O'BRIEN, A.D. Activation of Shiga-like toxin by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. **Infection and Immunity**, v.64, n.5, p.1569-1576, 1996.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. ed. **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Cap. 35, p.331-341.

MIDGLEY, J.; FEGAN, N.; DESMARCHELIER, P. Dynamics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in feedlot cattle. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.85-89, 1999.

MILLER, L.G.; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157: H7 acid tolerance and survival in apple cider. **Journal of Food Protection**, v.57, n.6, p.460-464, 1994.

MORA, A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v.156, p.793-806, 2005.

MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DHABI, G.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M.P.; ECHEITA, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. **BMC Microbiology**, v.7, p.13-21, 2007.

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

NICHOLLS, L.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular and Microbiology**, v.35, p.275-288, 2000.

NOU, X.; RIVERRA-BETANCOURT, M.; BOSILEVAC, J.M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; GWARTNEY, B.L.; REAGAN, J.O.; KOOHMARAIE, M. Effect of chemical dehairing on the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae on carcasses in a commercial beef processing plant. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.2005-2009, 2003.

NOUGAYRÈDE, J.-P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cellular Microbiology**, v.5, n.6, p. 359-372, 2003.

O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiological Reviews**, v.51, n.2, p.206-220, 1987.

O'BRIEN, A.D.; LA VECK, G.D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.40, n.2, p.675-683, 1983.

OLIVEIRA, M.G.; BRITO, J.R.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C.; VIEIRA, M.A.M.; NAVES, Z.V.F.N.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.139-146, 2008.

OLSEN, S.J.; MILLER, G.; BREUER, T.; KENNEDY, M.; HIGGINS, C.; WALFORD, J.; McKEE, G.; FOX, K.; BIBB, W.; MEAD, P. A waterborne outbreak of *Echerichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: Implications for rural water systems. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.370-375, 2002.

ORDEN, J.A.; CID, D.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; GARCÍA, S.; MARTÍNEZ, S.; FUENTE, R. de la. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.29-35, 2002.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, n.7, p.699-704, 1992.

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 new intimin variant. **Infection and Immunity**, v.68, n.1, p.64-71, 2000.

PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; LUCCHESI, P.M.A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; ETCHEVERRIA, A.I.; ARROYO, G.H.; PARMA, A.E. First isolation of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. **BMC Microbiology**, v.2, p.6-10, 2002.

PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; ETCHEVERRIA, A.I.; ARROYO, G.H.; USERA, M.A.; PARMA, A.E. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.3-9, 2004.

PARK, S.; WOROBO, R.W.; DURST, R.A. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: A literature review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, n.6, p.481-502, 1999.

PARK, C.H.; KIM, H.J.; HIXON, D.L.; BUBERT, A. Evaluation of the Duopath Verotoxin Test for detection of Shiga toxin in cultures of human stools. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.6, p.2650-2653, 2003.

PARMA, A.E.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; VIÑAS, M.R.; BLANCO, M. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. **European Journal of Epidemiology**, v.16, p.757-762, 2000.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.3, p.450-479, 1998.

PATON, A.W.; WOODROW, M.C.; DOYLE, R.M.; LANSER, J.A.; PATON, J.C. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3357-3361, 1999.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P. WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and immunity**, v.69, n.11, p.6999-7009, 2001.

PELAYO, J.S.; SCALETSKY, I.C.; PEDROSO, M.Z.; SPERANDIO, V.; GIRON, J.A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L.R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, p.41-49, 1999.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.185-192, 2004.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.284-288, 2007.

PERSSON, S.; OLSEN, K.E.P.; ETHELBERG, S.; SCHEUTZ, F. Subtyping methods for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.2020-2024, 2007.

PETERSON, R.E.; KLOPFENSTEIN, T.J.; MOXLEY, R.A.; ERICKSON, G.E.; HINKLEY, S.; BRETSCHNEIDER, G.; BERBEROV, E.M.; ROGAN, D.; SMITH, D.R. Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v.70, n.11, p.2568-2577, 2007.

PIÉRARD, D.; Van DAMME, L.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4585-4587, 1997.

PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.11, p.3317-3322, 1998.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.540-545, 1990.

PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; De CHAMPS, C.; PALCOUX, J.B.; REYNAULD, A.; SCHEUTZ, F.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1023-1031, 2000.

PRADEL, N.; BERTIN, Y.; MARTIN, C.; LIVRELLI, V. Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.07, p.2118-2128, 2008.

PulseNet Protocols – Center for Disease Control and Prevention. Disponível: <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm> Acesso em: 02 jul. 2007.

RAMOTAR, K.; WALDHART, B.; CHURCH, D.; SZUMSKI, R.; LOUIE, T.J. Direct detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in stool samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p.519-524, 1995.

REID, S.D.; BETTING, D.J.; WHITTAM, T.S. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2719-2722, 1999.

REINSTEIN, S.; FOX, J.T.; SHI, X.; NAGARAJA, T.G. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gallbladders of beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.3, p.1002-1004, 2007.

REY, J.; SÁNCHEZ, S.; BLANCO, J.E.; MENDONZA, J.H.de; MENDONZA, M.H. de; GARCÍA, A.; GIL, C.; TEJERO, N.; RUBIO, R.; ALONSO, M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.212-217, 2006.

RIGOBELLO, E.C.; GAMEZ, H.J.; MARIN, J.M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J.A.; ÁVILA, F.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.305-310, 2006a.

RIGOBELLO, E.C.; STELLA, A.E.; ÁVILA, F.A.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.194-198, 2006b.

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

RITCHIE, J. M.; WAGNER, P.L. ; ACHESON, D.W. ; WALDOR, M.K. Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.2, p.1059-1066, 2003.

RODOLPHO, D. ; MARIN, J.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butchereries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.599-602, 2007.

ROSSER, T.; DRANSFIELD, T.; ALLISON, L.; HANSON, M.; HOLDEN, N.; EVANS, J.; NAYLOR, S.; La RAGIONE, R.; LOW, C.J.; GALL, D.L. Pathogenic potential of emergent sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. **Infection and Immunity**, v.76, n.12, p.5598-5607, 2008.

RÜSSMANN, H.; SCHMIDT, H.; HEESEMANN, J.; CAPRIOLI, A.; KARCH, H. Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.338-343, 1994.

SALVADORI, M.R.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S., BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.230-235, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. eds. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 1989.

SANTOS, R.F.C.; VIANA, M.S.R.; NOVAES, R.M.P. de; NASCIMENTO, J.S. *E. coli* O157:H- estudo de um caso ocorrido no Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v.21, p.377-378, 2007.

SCHEUTZ, F.; CHEASTY, T.; WOODWARD, D.; SMITH, H.R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.112, p.569-584, 2004.

SCHMIDT, C.K.; McKEE, M.L.; O'BRIEN, A.D. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. **Infection and Immunity**, v.59, n.3, p.1065-1073, 1991.

SCHMIDT, H.; RÜSSMANN, H.; KARCH, H. Virulence determinants in nontoxigenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhea. **Infection and Immunity**, v.61, n.11, p.4894-4898, 1993.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1205-1208, 2000.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.

SHENEMAN, D.E.; KATZ, D.S. An inexpensive sample mold for pulsed-field electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v.53, p.127-129, 2003.

SILVEIRA, N.F.A.; SILVA, N.; CONTRERAS, C.; MIYAGUSKU, L.; BACCIN, M. de L.F.; KOONO, E.; BERAQUET, N.J. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.62, n.11, p.1333-1335, 1999.

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

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 573p.

SONNTAG, A.-K.; BIELASZWSKA, M.; MELLMANN, A.; DIERKSEN, N.; SCHIERACK, P.; WIELER, L.H.; SCHMIDT, M.A.; KARCH, H. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8855-8863, 2005.

SOUZA, R.L.de; NISHIMURAB, L.S.; GUTH, B.E.C. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.59, p.223-225, 2007.

SPEARS, K.J.; ROE, A.J.; GALLY, D.L. A comparison of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.225, p.187-202, 2006.

STEPHAN, R.; RAGETTLI, S.; UNTERMANN, F. Prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.335-341, 2000.

STOFFREGEN, W. C.; POHLENZ, J. F. L.; DEAN-NYSTROM, E. A. *Escherichia coli* O157:H7 in the gallbladders of experimentally infected calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p.79–83, 2004.

STOPFORTH, J.D.; LOPES, M.; SHULTZ, J.E.; MIKSCH, R.R.; SAMADPOUR, M. Location of bung bagging during beef slaughter influences the potential for spreading pathogen contamination on beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v.69, p.1452-1455, 2006.

STRACHAN, N.J.C.; DUNN, G.M.; LOCKING, M.E.; REID, T.M.S.; OGDEN, I.D. *Escherichia coli* O157: Burger bug or environmental pathogen? **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.129-137, 2006.

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 1. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.3, p.1116-1122, 1988.

SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J.; HUNTER, S. B.; TAUXE, R. V. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Disease**, v.7, n.3, p.383-389, 2001.

TARR, P.I.; BILGE, S.S.; JAMES, C.; VARU, J.R.; JELACIC, S.; HABEED, R.L.; WARD, T.R.; BAYLOR, M.R.; BESSER, T.E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infection and Immunity**, v.68, n.3, p.1400-1407, 2000.

TARR, P.I. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: distinct mechanisms of pathogenesis. **Kidney International**, v.75, supl.112, p.s29-s32, 2009.

TATSUNO, I.; HORIE, M.; ABE, H.; MIKI, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; TANIGUCHI, H.; KAMIYA, S.; HAYASHI, T.; SASAKAWA, C. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infection and Immunity**, v.69, n.11, p.6660-6669, 2001.

TE LOO, D.M.W.M.; MONNENS, L.A.H.; van de VELDEN, T.J.A.M.; VERMEER, M.A.; PREYERS, F.; DEMACKER, P.N.M.; van den HEUVEL, L.P.W.J.; van HINSBERGH, V.W.M. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. **Blood**, v.95, n.11, p.3396-3402, 2000.

TIMM, C.D.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.M.; GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; MOREIRA, C.N.; ALEIXO, J.A.G. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.419-425, 2007.

TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VAN HOOFF, J.; CORNELIS, M.; De ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.63-69, 2003.

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

VANSELOW, B.A.; KRAUSE, D.O.; McSWEENEY, C.S. The Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, their ruminant hosts, and potential on-farm interventions: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.219-244, 2005.

VARELA-HERNÁNDEZ, J.J.; CABRERA-DIAZ, E.; CARDONA-LÓPEZ, M.A.; IBARRA-VELÁSQUEZ, L.M.; RANGEL-LILLALOBOS, I.I.; CASTILLO, A.; TORRES-VITELA, M.R.; RAMIREZ-ÁLVAREZ, A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.237-241, 2007.

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

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; NISHIMURA, L.S.; CERGOLÉ-NOVELLA, M.C.; GUTH, B.E.C. Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolates in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.3, p.798-804, 2006.

VERNOZY-ROZAND, C.; MONET, M.P.; BERTIN, Y.; TRABLY, F.; GIRARDEAU, J.P.; MARTIN, C.; LIVRELLI, V.; BEUTIN, L. Serotyping, *stx2* subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.4, p.2556-2559, 2004.

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

VICENTE, H.I.G.; AMARAL, L.A. do; CERQUEIRA, A.M.F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.217-222, 2005.

VU-KHAC, H.; CORNICK, N.A. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.356-363, 2008.

WEINSTEIN, D.L.; JACKSON, M.P.; SAMUEL, J.E.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* responsible for edema disease of swine. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.10, p.4223-4230, 1988.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.D.; McDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, v.4, p.405-412, 2002.

WOERNER, D.R.; RANSOM, J.R.; SOFOS, J.N.; DEWELL, G.A.; SMITH, G.C.; SALMAN, M.D.; BELK, K.E. Determining the prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and beef from the feedlot to the cooler. **Journal of Food Protection**, v.69, n.12, p.2824-2827, 2006.

YILMAZ, A.; GUN, H.; UGUR, M.; TURAN, N.; YILMAZ, H. Detection and frequency of VT1, VT2 and *eeA* genes in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from cattle, cattle carcasses and abattoir environment in Istanbul. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.213-217, 2006.

ZAKI, M.E.S.; EL-ADROSY, H. Diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection, contribution of genetic amplification technique. **Microbes and Infections**, v.9, p.200-203, 2007.

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

ZHANG, W.L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **Journal of clinical Microbiology**, v.40, n.12, p.4486-4492, 2002b.

ZHANG, W.L.; BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, A.W.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.01, p.558-561, 2005.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; BESSER, R.E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in apple cider with and without preservatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.08, p.2526-2530, 1993.

ZWEIFEL, C.; SCHUMACHER, S.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; TASARA, T.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.37-45, 2005.

## Anexo A

Composição (g.L<sup>-1</sup>) do caldo CAYE (Merck, Alemanha) – pH 7,0

- Casaminoácidos	20,0
- Extrato de Levedura	6,0
- D(+) glucose	2,5
- Cloreto de sódio	2,5
- Fosfato di-potássio hidrogênio	8,71
- Sulfato de Magnésio	0,05
- Cloreto de Manganês	0,005

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min. a 121°C.

## Anexo B

Composição (g.L<sup>-1</sup>) do caldo Penassay – pH 7,0

- Extrato de carne	1,5
- Extrato de Levedura	1,5
- Peptona	5,0
- Dextrose	1,0
- Cloreto de Sódio	3,5
- Fosfato dipotássio	3,68
- Fosfato monopotássio	1,32

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min. a 121°C.

## Anexo C

Composição (g.L<sup>-1</sup>) do PBS (salina tampão fosfato) – pH 7,3

- Cloreto de sódio	8,5
- Cloreto de potássio	0,2
- Fosfato dissódico hidrogênio	1,91
- Fosfato de potássio dihidrogênio	0,38

O tampão foi esterilizado em autoclave por 15 min. a 121°C.