



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ARIANE MAYUMI SAITO BERTÃO

**SOROTIPOS E MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS
DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA
(STEC) ISOLADAS DE BEZERROS DA REGIÃO NORTE DO
ESTADO DO PARANÁ**

Londrina
2006

ARIANE MAYUMI SAITO BERTÃO

**SOROTIPOS E MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS
DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA
(STEC) ISOLADAS DE BEZERROS DA REGIÃO NORTE DO
ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Halha Ostrensky Saridakis

Londrina
2006

ARIANE MAYUMI SAITO BERTÃO

**SOROTIPOS E MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS
DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA
(STEC) ISOLADAS DE BEZERROS DA REGIÃO NORTE DO
ESTADO DO PARANÁ**

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Halha Ostrensky Sarida

Dr Domingos da Silva Leite

Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina, 27 de março de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu grande amor – Cleomar Luciano Bertão, meu esposo – a personificação da palavra Companheiro: o meu reconhecimento por todos estes anos de dedicação, apoio e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida e por todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Mieco e Massamitsu Nakagawa, que sempre me mostraram o caminho do bem e do trabalho, meus grandes exemplos na vida.

À Profª Drª Halha Ostrensky Saridakis, exemplo de dedicação e amor ao ensino e à pesquisa, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo e paciência, desde os meus tempos de estagiária e durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr Domingos da Silva Leite pelo inestimável apoio e ensinamentos transmitidos.

À Profª Drª Jacinta Sanchez Pelayo pelos ensinamentos e amizade.

À Profª Drª Marilda C. Vidotto pelo apoio e amizade.

Aos docentes e à coordenação do Programa de Mestrado em Microbiologia, em especial às Profªs Drªs Márcia Cristina Furlaneto e Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela orientação no exame de qualificação e à Profª Drª Rosa Elisa Linhares, pelo fornecimento das células em cultivo.

Ao Profs Drs Emerson José Venâncio e Phileno Pinge Filho pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos amigos da turma do Mestrado: Adriana Knob, Denise Scoaris, Evelyn Carignano, Fabrício Benatti, Flávia Spago, Gisele Milani, Jesiane Batista, Lígia Faccin, Márcia Mata, Narjara Oliveira, Raíssa Pedroso, Sérgio Rocha e Tatiana Brasil. Sucesso a todos!

Aos secretários Rosilda Alvarenga e João Alexandre Lopes pela amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia – CCB/UEL, doutorandas Cláudia Ross e Floristher Carrara, mestrandos Marcos Tanita, Raquel Girardello, Alessandra Nimtz, Kathelin Lascowsky, Carlos Alfredo Queiroz e Marcelo Carneiro; estagiários Paula Barbosa, Maria

Rachel Brito, Lígia Rogeri, Dielen Hennig, Gisele Viana e Rafael Melo pelo apoio, incentivo e, principalmente, pela amizade, intensificada no convívio diário. Minha especial gratidão às estagiárias Camila Sacchetto e Juliana Terssariol pelo apoio neste trabalho.

Às amigas Eliana Vespero e Ligiane Silva, pela calorosa amizade, estímulo, conselhos e apoio técnico.

À Fabiani de Paiva Vieira pela amizade e contribuição neste trabalho.

À Claci Stempinhaki pela amizade e colaboração técnica.

Aos amigos do Departamento de Ciências Patológicas – CCB/UEL: Pedro Dionísio Filho, Jesus Antônio Vargas, Alexandre Saito (Teco) e Érica Kavati pelo apoio e amizade;

À veterinária Kerlei Medici, do setor de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (HV-UEL) pelo fornecimento das células em cultivo.

Aos amigos do Laboratório de Antígenos Bacterianos II, Unicamp: Monique Tiba, Mirtis Ferraz, Michelle Silva, Maria Cláudia Peroto, Gisela Domingos e Márcia Rocha por toda amizade e apoio e, em especial, ao Erivaldo Silva, Cláudia de Moura e Daniela Domingos, pela realização das sorogrupagens e inestimável colaboração nas sorotipagens e PCRs.

Aos meus familiares e amigos por entenderem as minhas ausências e pelo amor e apoio incondicionais, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao meu filho Alexandre, presente de Deus, ainda em meu ventre e já participando intensamente das minhas conquistas.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

BERTÃO, Ariane Mayumi Saito. **Sorotipos e marcadores de virulência de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga (STEC) isoladas de bezerros da região norte do estado do Paraná.** 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Selecionamos para este estudo 86 cepas de *Escherichia coli* isoladas de 48 bezerros, 24 não-diarréicos e 24 diarréicos. Estas cepas foram examinadas quanto à presença de marcadores de virulência por PCR: *stx1*, *stx2*, *ehly*, *eaeA*, *saa*, *lpf_{O113}*, *k99*, *f41*, *clpG*, *f17*, *sta*, *lt-II*, *cnf* e *astA*. Todos os isolados foram sorotipados e examinados quanto à expressão de Stx e Ehly. Nos isolados de animais não-diarreicos, 20/43 (46,5%) foram Stx1⁺; 7/43 (16,3%) Stx2⁺ e 16/43 (37,2%) Stx1⁺ Stx2⁺. O gene *lpf_{O113}* foi detectado em 35/43 (81,4%), 6/43 (14%) foram EAST-1⁺; Saa⁺ e Ehly⁺ foram ambos detectados em 4/43 (9,3%); F17⁺, CS31A⁺ e LT-II⁺ em 3/43 (7%) cada; 2/43 (4,7%) foram CNFs⁺ e 1/43 (2,3%), *eaeA*⁺. Quatro dos 4 (100%) dos isolados *Ehly*⁺ e 14/43 (32,6%) *stx*⁺ expressaram enterohemolisina e Stx, respectivamente. Entre os animais diarréicos, 26/43 (60,5%) foram Stx1⁺; 3/43 (7%) Stx2⁺ e 11/43 (25,6%) Stx1⁺ Stx2⁺. O gene *lpf_{O113}* foi detectado em 36/43 (83,7%), 6/43 (14%) foram East-1⁺; 5/43 (11,6%), CS31A⁺; 3/43 (7%) *eaeA*⁺. *Ehly*⁺ and LT-II⁺ estiveram ambos presentes em 2/43 (4,7%) e Saa, CNFs e F17 em 1/43 (2,3%) cada. Um dos 2 (50%) isolados *Ehly*⁺ e 22/40 (50%) *stx*⁺ expressaram enterohemolisina e Stx, respectivamente. Entre os 86 isolados de *E. coli*, nenhuma cepa foi K99⁺, STa⁺ ou F41⁺. No número total de animais, os sorogrupos O1, O2, O7, O12, O20 e O22 foram os mais freqüentes, distribuídos entre 42 isolados enquanto 27 foram considerados não-tipáveis (NT). Dezesete antígenos H (H1, H2, H3, H6, H14, H16, H18, H19, H21, H25, H28, H32, H38, H39, H40, H48, H55) foram distribuídos entre 66 isolados enquanto 3 foram imóveis (NM) e 17 foram considerados não-tipáveis (NT). Não foram observadas diferenças significativas nas freqüências dos marcadores de virulência ou suas associações entre as cepas de animais diarréicos e não diarréicos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Virulência (Microbiologia). Diarréia em bovinos.

ABSTRACT

We selected for this study, 86 *Escherichia coli* strains isolated from 48 calves, 24 healthy and 24 diarrheic animals. These strains were examined for the presence of virulence markers by PCR: *stx1*, *stx2*, *ehly*, *eaeA*, *saa*, *lpf_{O113}*, *k99*, *f41*, *clpG*, *f17*, *sta*, *lt-II*, *cnf* and *astA*. All isolates were serotyped and examined for the Stx and Ehly expression. Among non-diarrheic animals 19/43 (44,2%) were shown to be Stx1⁺, 7/43 (16,3%) carried Stx2⁺ and 16/43 (37,2%) were Stx1⁺ Stx2⁺. *Lpf_{O113}* gene were detected in 35/43 (81,4%), 6/43 (14%) were EAST-1⁺, Saa⁺ and Ehly⁺ were detected in 4/43 (9,3%); F17⁺, CS31A⁺ and LT-II⁺ were found in 3/43 (7%) each; 2/43 (4,7%) were CNFs⁺, 1/43 (2,3%) were eaeA⁺. Four of the 4 Ehly⁺ isolates (100%) and 14/43 *stx1*⁺ (32,6%) expressed enterohemolysin and Stx, respectively. Among diarrheic animals, 26/43 (60,5%) were Stx1⁺, 3/43 (7%); Stx2⁺ and 11/43 (25,6%) were Stx1⁺ Stx2⁺. *Lpf_{O113}* gene were detected in 36/43 (83,7%), 6/43 (14%) were EAST-1⁺, 5/43 (11,6%) were CS31A⁺, 3/43 (7%) were eaeA⁺, Ehly⁺ and LT-II⁺ were both present in 2/43 (4,7%); Saa, CNFs and F17 were found in 1/43 (2,3%) each. One of the 2 isolates (50%) Ehly⁺ and 22/40 (55%) *stx*⁺ expressed enterohemolysin and Stx, respectively. Among 86 *E. coli* isolates, no strain, was K99⁺, STa⁺ or F41⁺ and serogroups O1, O2, O7, O12, O20 and O22 were the most frequent, distributed among 42 isolates and 27 were considered non typable (NT). Seventeen H antigens (H1, H2, H3, H6, H14, H16, H18, H19, H21, H25, H28, H32, H38, H39, H40, H48, H55) were distributed among 66 isolates whereas 3 were non-mobile (NM) and 17 were considered non typable. No significant difference was observed on the frequency of virulence markers or their associations between diarrheic and no diarrheic strains.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de virulência utilizadas para a definição das categorias de <i>E. coli</i> diarreiogênicas (DEC) na rotina laboratorial.....	12
Tabela 2 – Seqüências de oligonucleotídios iniciadores, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, cepas padrão e condições utilizadas neste trabalho.....	23
Tabela 3 – Sorogrupos de amostras de <i>E. coli</i> isoladas de bezerros diarreicos e não-diarreicos	30
Tabela 4 – Sorotipos e principais perfis genotípicos e fenotípicos dos isolados de bezerros diarreicos	32
Tabela 5 – Sorotipos e principais perfis genotípicos e fenotípicos dos isolados de bezerros não-diarreicos	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 AMOSTRAS	20
3.2 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	20
3.3 PESQUISA DE GENES PARA MARCADORES DE VIRULÊNCIA	20
3.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA TOXINA SHIGA (STX) EM ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	25
3.4.1 Preparo das Amostras	25
3.4.2 Preparo da Linhagem Celular e Teste de Citotoxicidade	25
3.5 ENSAIO PARA A DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENTEROHEMOLISINA	26
3.6 DETERMINAÇÃO DOS SOROGRUPOS	26
3.6.1 Preparação das Amostras	26
3.6.2 Reação de Aglutinação em Microplaca	27
3.7 DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS	27
3.7.1 Preparação das Amostras	27
3.7.1.1 Ativação da motilidade	27
3.7.1.2 Preparo do antígeno H	28
3.7.2 Aglutinação em Tubos	28
4 RESULTADOS	29
4.1 DETECÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES <i>STX</i>	29
4.2 DETERMINAÇÃO DOS SOROGRUPOS E SOROTIPOS	29
4.3 DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM FATORES DE VIRULÊNCIA POR PCR	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	37

REFERÊNCIAS	38
ANEXO	49
<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos.....	50

1 INTRODUÇÃO

As diarreias em bovinos de até três semanas de idade ocorrem com frequência, sendo *Escherichia coli* um dos principais agentes (Garcia et al., 1999). Manifesta-se como uma diarreia de cor esbranquiçada, de cheiro desagradável; o animal torna-se apático; há perda de apetite, emagrecimento progressivo e, em alguns casos, este quadro de colibacilose entérica em bezerros pode evoluir negativamente, levando à desidratação e morte. Estima-se que a taxa de mortalidade de bezerros no período neonatal oscile entre 3 a 30%, sendo a diarreia responsável por 75% desta mortalidade

(Embrapa Gado de Corte, 1999). Já na colibacilose sistêmica, a bactéria invade o sistema circulatório e pode atingir outros órgãos. O curso da doença varia de 2 a 4 dias, mas a morte pode ocorrer em poucas horas após o desenvolvimento da diarreia. A mortalidade de bezerros pela colibacilose representa um prejuízo econômico importante, pois as carcaças devem ser descartadas, sem qualquer aproveitamento. Além disso, os animais que sobrevivem à doença podem apresentar retardo no desenvolvimento e diminuição na produção de leite (Blood et al., 1983; Acres, 1985; Gyles, 1994; Sussman, 1996)

E. coli, enterobactéria Gram-negativa que divergiu da linhagem *Salmonella* há cerca de 100 milhões de anos, é o microrganismo anaeróbico facultativo predominante na microbiota colônica humana (Mead & Griffin, 1998).

Além de seu papel na microbiota colônica, a espécie *E. coli* compreende cepas de patógenos intestinais e extra-intestinais. Os patógenos intestinais são também conhecidos como *E. coli* diarreiogênica (DEC), um grupo com seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que se adere difusamente (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998). Recentemente, a categoria EPEC foi subdividida em duas: EPEC típica (t-EPEC) e EPEC atípica (a-EPEC). Esta última tem sido descrita com maior frequência que t-EPEC tanto em São Paulo como na Europa e nos Estados Unidos e partilha várias características com EHEC, tais como: genética, sorotipos, produção de toxinas e reservatório animal (Trabulsi et al., 2002). Estudos realizados com amostras fecais de crianças diarreicas e não-diarreicas na cidade de Londrina, Paraná, demonstraram prevalência de t-EPEC nas amostras diarreicas, com predomínio do sorogrupo O119:H6 e detecção de cepas O-não tipáveis (Kobayashi et al., 2000; Nunes et al., 2003). Saridakis et al. (1997), também na cidade de Londrina, isolaram, em amostras fecais de bezerros diarreicos,

cepas de *E. coli* dos sorogrupos O119 e O128, além do sorotipo O26:H11, *eaeA*-positivas e não-produtoras de Stx, portanto, a-EPEC (Trabulsi et al., 2002). *E. coli* é classificada sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica: antígenos O ou somáticos para os sorogrupos e antígenos flagelares ou H para os sorotipos. Podem, ainda, expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogênese (Campos et al., 2004).

Embora várias diferenças entre as DEC tenham sido descritas, atualmente, alguns fatores de virulência têm sido utilizados para definir essas categorias (Tabela 1)

Tabela 1 – Características de virulência utilizadas para a definição das categorias de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) na rotina laboratorial.

categorias de DEC	Cat	Características de virulência
EPEC	t-	Presença do gene <i>eae</i> e da região EAF
EPEC	a-	Presença do gene <i>eae</i> e ausência dos genes <i>stx</i>
EC	EH	Presença do gene <i>eae</i> e dos genes <i>stx</i>
EC	EA	Presença do plasmídio AA
EC	DA	Presença do gene <i>daaC</i>
EC	ET	Presença dos genes <i>lt</i> ou <i>st</i> e produção de uma
	ou duas toxinas	
C	EIE	Presença do gene <i>ipa</i> e teste de Séreny positivo.

Referência: Campos et al., 2004.

O gene *eae* codifica a adesina não-fimbrial intimina (Jerse et al., 1990) e a sua presença está correlacionada à presença da região LEE (*locus of enterocyte effacement*), uma ilha de patogenicidade de 35 kb cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E (*attaching and effacing*). Não foram relatadas exceções para esta generalização, portanto, a detecção de *eae* é considerada suficiente para levantamentos epidemiológicos (McDaniel et al., 1995). O plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*), além do operon da fímbria BFP (*Bundle-forming pillus*), envolvida na adesão inicial de t-EPEC à

mucosa intestinal, também transporta a região EAF, a partir da qual foi construída uma sonda genética com o mesmo nome, utilizada para a identificação de cepas de EPEC (Nataro et al., 1985). A sonda EAEC, ou sonda AA, desenvolvida por Baudry et al (1990) e utilizada na caracterização das cepas de EAEC, é um fragmento de 1,0 kb, resultante da digestão do plasmídeo AA de 65 MDa, da cepa 042, pela enzima *Sau* 3a. As cepas DAEC podem ser detectadas com a sonda DAEC, um fragmento de 700 pb derivado do gene *daaC*, que codifica uma proteína *usher*, necessária para a expressão da fímbria F1845 (Bilge et al., 1993). Os genes plasmidiais *ipa* (*ipaA*, *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* e *ipaH*), presentes em *Shigella* spp e EIEC, codificam proteínas de membrana externa e são responsáveis pelo fenótipo invasivo destas cepas (Sansone et al., 1981)

As cepas de *E. coli* produtoras de Stx receberam a seguinte nomenclatura (Calderwood et al, 1996): *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) para as cepas de *E. coli* que carregam os genes que codificam Stx e EHEC para cepas que, além de Stx, apresentam como marcador de virulência os genes para a lesão A/E (Mainil & Daube, 2005). As cepas de STEC também são denominadas EHEC LEE-negativas ou eae-negativas (Luck et al, 2005).

A maioria destes fatores de virulência é codificada por fragmentos de DNA adquiridos horizontalmente: ilhas de patogenicidade, transposons, plasmídios e fagos (Mead & Griffin, 1998).

Cepas de *E. coli* capazes de causar doenças extraintestinais são denominadas conjuntamente EXPEC. Assim, tem sido descritas cepas associadas às infecções urinárias (UPEC), à meningite neonatal (MAEC) e bacteremia (Campos et al., 2004).

De acordo com alguns autores, cepas de *E. coli* denominadas necrotoxigênicas possuem a capacidade de produzir toxinas denominadas fatores necrotizantes citotóxicos 1 e 2 (CNF1 e CNF2) (De Rycke et al., 1990). Cepas produtoras de CNF1 têm sido associadas a infecções extraintestinais humanas (Alonso et al., 1987), enquanto cepas CNF2-positivas têm sido isoladas de bezerros com diarreia e/ou septicemia (Oswald et al., 1991). Por outro lado, Blanco et al. (1993, 1998) e Burns et al. (1996) descreveram cepas de NTEC produtoras de CNF2 isoladas de bezerros não-diarreicos. Assim, o papel de cepas de NTEC na patogênese da diarreia bovina é ainda controverso.

A infecção por cepas de ETEC é causa significativa de diarreia em crianças e viajantes em países em desenvolvimento, também é uma causa comum de colibacilose em animais jovens, principalmente leitões e bezerros. Caracteristicamente, cepas de ETEC se aderem ao epitélio intestinal, colonizando-o sem induzir alterações morfológicas significantes e secretam enterotoxinas que alteram as funções de absorção e de secreção dos enterócitos

(Nagy & Fekete, 2005). Dentre os fatores de colonização associados à colibacilose bovina destacam-se as adesinas fimbriais K99, F41 e F17 (Franck et al., 1998; Orden et al., 1999) e a adesina não-fimbrial CS31A (Bertin et al., 1998). As enterotoxinas das cepas de ETEC são codificadas por plasmídios e podem ser classificadas em duas categorias: enterotoxinas termo-lábeis de alto peso molecular, LTs e variantes, produzidas principalmente por cepas de ETEC humanas e suínas; e enterotoxinas termo-estáveis de baixo peso molecular, STs, produzidas por cepas de ETEC humanas em países em desenvolvimento, bem como de colibacilose em leitões e bezerros (O'Brien & Holmes, 1986). STs, principalmente STa, é a enterotoxina mais comumente associada à colibacilose bovina, enquanto a variante II da toxina LT, LT-II, não tem sua capacidade de causar diarreia comprovada, embora tenha sido encontrada em cepas de ETEC isoladas de bezerros diarréicos (Nagy & Fekete, 1999). Em cepas de EAEC isoladas de humanos, uma nova ST, EAST-1 (*enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin I*) foi descrita (Savarino et al., 1993). O gene que codifica EAST-1, *astA* é plasmidial e parece ter sido adquirido por outras classes de DEC: Savarino et al. (1996) mostraram a presença desse gene em 100% das amostras de EHEC O157:H7 analisadas, 41% de ETEC e 22% de EPEC. Embora EAST-1 tenha afinidade pelo receptor para STa, GC-c, os genes estruturais destas toxinas não apresentam seqüências homólogas significativas (So & McCarthy, 1980).

A categoria STEC, cujo principal fator de virulência, a produção de citotoxinas (Stx1 e/ou Stx2) é codificado por genes fágicos, está associada a casos de colite hemorrágica (HC), síndrome hemolítico-urêmica (HUS, cuja possível seqüela mais grave é a falência renal) e púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) em seres humanos (Nataro & Kaper, 1998). Ensaios imunológicos de neutralização demonstraram que as toxinas Shiga, principais marcadores de virulência de cepas de STEC, podem ser divididas em dois grupos antigênicos. O grupo um, Stx1, é neutralizado por anti-soro da citotoxina de *S. dysenteriae* 1, pois são consideradas idênticas (O'Brien et al., 1983). O grupo 2, Stx2, é neutralizável apenas por anti-Stx2 (O'Brien & Holmes, 1987). Stx 1 e Stx2 são codificadas por fagos lambda temperados e apresentam 55 e 57% das seqüências genéticas de suas subunidades A e B idênticas, respectivamente (Jackson et al., 1987). Stx1 é considerada altamente conservada e suas variantes apresentam poucas diferenças nas suas seqüências genéticas, sem maiores conseqüências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas (Melton-Celsa & O'Brien, 1998; Duffy et al., 2001; Thorpe et al., 2002). No entanto, algumas variantes de Stx1 foram descritas: Stx1c e Stx1OX3 encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de humanos e ovinos (Koch et al., 2001; Zhang et al., 2002) e Stx1d, de amostras bovinas (Bürk et al., 2003). Cinco

variantes biológicas de Stx2 foram descritas, as quais diferem umas das outras por sua antigenicidade, toxicidade e seqüência genética (Melton-Celsa & O'Brien, 1998; Duffy et al., 2001; Thorpe et al., 2002): Stx2, Stx2c, Stx2d e Stx2f (anteriormente denominada Stx2ev) isoladas de humanos e Stx2e, isolada de suínos.

A estrutura A-B da família das toxinas Shiga, holotoxinas de aproximadamente 70 kDa, é conservada entre seus membros. A subunidade A, de 32 kDa, pode ser clivada proteoliticamente, resultando em dois peptídios: A1 e A2, de 28 e 4 kDa, respectivamente, e que permanecem ligados por uma ligação dissulfeto. O peptídio A1 apresenta atividade enzimática (N-glicosidase) enquanto A2 tem a função de ligar a subunidade A ao pentâmero formado por cinco subunidades B idênticas, de 7,7kDa cada. O pentâmero B liga a toxina ao receptor glicolipídico específico, presente na superfície da célula eucariótica, globotriasilceramida (Gb3) para Stx1 e Stx2 e globotetrasilceramida (Gb4) para Stx2e. Após a ligação, a holotoxina sofre endocitose através de depressões da membrana citoplasmática da célula eucariótica revestidas pela proteína clatrina (*coated pits*), formando uma vesícula selada com a holotoxina em seu interior. No citoplasma, esta vesícula pode se fundir com lisossomos, resultando na degradação da toxina. Porém, em células eucarióticas sensíveis a Stx, as vesículas são transportadas até o retículo endoplasmático via complexo de Golgi, alcançando, então, o citosol. Durante este processo, a subunidade A é clivada pela enzima furina, gerando o fragmento cataliticamente ativo, A1 e o fragmento A2, cuja ligação dissulfeto é posteriormente reduzida. O fragmento A1 livre tem atividade RNA N-glicosidase, e interage com a unidade 60S do ribossomo. Ao remover um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA eucariótico, A1 livre impede a ligação do amino-acil-RNA transportador a esta subunidade, inibindo irreversivelmente a etapa de alongamento da síntese protéica e causando a morte celular (Paton & Paton, 1998).

Em EHEC, assim como em EPEC, outros fatores de virulência estão localizados cromossomalmente em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E (*attaching and effacing*). Os genes da região LEE codificam uma adesina não fimbrial, a intimina (*eae*); um sistema de secreção do tipo III (proteínas Esc e Sep); chaperoninas (proteínas Ces); proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e proteínas efetoras (EspF, EspG e Map), assim como o receptor para intimina (Tir). A função de muitos quadros abertos de leitura (*open reading frames* - ORFs) ainda é desconhecida. (Girard et al, 2005). A intimina é fator-chave de colonização para EHEC em ovinos (Cornick et al., 2002), bovinos recém-nascidos e adultos (Dean-Nystrom et al., 1998). No entanto, mutantes

intimina-negativos ainda são capazes de colonizar certos locais do trato gastrointestinal dos ruminantes, indicando que outros fatores de colonização podem estar presentes (van Diemen et al., 2005). Cepas de EHEC podem apresentar ainda, um plasmídio altamente conservado de 60 MDa, pO157 (Schmidt et al., 1994). Este plasmídio está presente também em cepas do sorotipo O26:H11 e na maioria de STEC isoladas de humanos (Beutin et al., 1994; Levine et al., 1987), cujos genes codificam possíveis marcadores de virulência adicionais: enterohemolisina (Schmidt et al., 1995), uma citolisina formadora de poro em células eucarióticas (Ehly); uma catalase-peroxidase (KatP) (Brunder et al., 1996); uma serina protease (EspP), capaz de clivar o fator V de coagulação humano (Brunder et al., 1997). Recentemente, dois novos fatores de adesão a células epiteliais foram descritos em cepas STEC O113:H21, ambos envolvidos em surtos distintos de HUS na Austrália: Paton et al. (2001) descreveram Saa, a primeira adesina caracterizada em cepas de *E. coli* LEE-negativas e Doughty et al (2002) descreveram LPF, fímbria longa polar identificada pela primeira vez em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Baumler et al. 1995).

HUS é considerada uma doença de origem alimentar foi inicialmente relacionada ao consumo de hambúrgueres, carne moída e laticínios contaminados com STEC (Riley, 1987). Nos Estados Unidos, a categoria STEC está associada a, aproximadamente, 110.000 casos de doenças e 90 mortes, anualmente (Mead et al., 1999). No Brasil, de acordo com os registros da AIH/DATASUS/MS, foram notificados 12 casos de HUS no estado de São Paulo no período de 1998/2000, com história anterior de diarreia e possível, porém não confirmado, envolvimento com *E. coli* O157:H7 (Brasil, CVE, 2001). O primeiro relato de isolamento de STEC de um paciente com HUS ocorreu em um hospital da cidade de São Paulo, no ano de 2001 (Guth, et al., 2002): uma criança, com história de diarreia aguda ocorrida três semanas antes da internação, cujos sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais levaram ao diagnóstico desta síndrome. A cepa isolada pertencia ao sorotipo O26:H11.

Embora o sorotipo O157:H7 esteja ligado à maioria dos surtos associados a STEC descritos mundialmente, estudos recentes indicam que a incidência deste sorotipo vem decaindo substancialmente (CDC, 2004). Em contraste, STEC não-O157 vem sendo isolada com maior frequência à partir de amostras fecais de pacientes com HUS (Banatvala et al., 2001; Jaeger et al., 2000), entre os quais os sorogrupos O26, O91, O103, O111 e O113 (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998) No Brasil, poucas cepas O157:H7 foram isoladas de humanos, no estado de São Paulo. Estes pacientes não apresentavam diarreia sanguinolenta (Irina et al, 2002).

O primeiro surto de colite hemorrágica ligado a EHEC sorotipo O157:H7 estava relacionado ao consumo de hambúrgueres contaminados, levando à suspeita de um reservatório bovino (Riley et al, 1983). Desde então, estudos em diferentes países tem demonstrado que o gado bovino é o principal reservatório de STEC/EHEC: na Argentina, segundo estudos de Sanz et al. (1998), a taxa de isolamento de STEC de bovinos adultos tratados a pasto foi de 22% no campo e, no abatedouro, 44%; enquanto Padola et al. (2004) isolaram STEC e EHEC sorotipo O157:H7 em 63 e 6,8% dos animais de uma fazenda de confinamento, respectivamente. Na Espanha, STEC foi isolada em 37% dos bezerros e em 35% dos bovinos adultos investigados (Blanco et al., 1997). Nos Estados Unidos, a prevalência de EHEC sorotipo O157:H7 no gado saudável varia de entre 2 a 20% dos animais (Mainil & Daube, 2005). Estes animais podem apresentar um quadro inicial de diarreia quando jovens e, quando se recuperam, tornam-se animais saudáveis, portadores de STEC (Verweyen et al, 2000).

No Brasil, Cerqueira et al. (1999) analisando gado leiteiro e de corte no Estado do Rio de Janeiro, constataram uma alta ocorrência dos genes *stx* nestes animais, detectados por PCR: 82% do gado leiteiro e 53% do gado de corte, sendo 1,5% dos isolados EHEC sorotipo O157:H7. Leomil et al. (2003), detectaram, por PCR, a ocorrência dos genes *stx* em 20% dos bezerros diarreicos e em 7,8% dos animais não-diarreicos das fazendas de corte do Estado de São Paulo estudadas. Moreira et al. (2003), analisando fazendas de leite da região de Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul, detectaram STEC em 49% dos animais através do ensaio de citotoxicidade em células Vero. Salvadori et al. (2003) pesquisando bezerros diarreicos da região centro-oeste detectou, por PCR, genes *stx* em 16.1% dos animais. Mais recentemente, Irino et al (2005), isolaram STEC em 25,5% dos animais pesquisados em fazendas de leite no estado de São Paulo. Os genes *stx* foram pesquisados por ensaios de hibridização de DNA em colônias. Dois novos sorotipos de STEC foram encontrados: O79:H14 e O98:H17, enquanto o sorotipo O178:H19, embora anteriormente descrito, fora recentemente detectado somente na Espanha (Blanco et al., 2004).

Elder et al (2000), examinando gado de corte em frigoríficos nos EUA, antes e após o abate, puderam isolar *E. coli* O157:H7 em 28% das fezes, 11 na pele/couro; e, na carcaça, em 43% antes da evisceração, 18% pós-evisceração e 2% após a lavagem da carcaça, pronta para o resfriamento. Cerqueira et al. (1997) encontraram, no Rio de Janeiro uma alta prevalência de STEC em produtos cárneos de origem bovina, cerca de 71%.

Embora doenças humanas associadas a STEC/EHEC têm sido pouco descritas no Brasil, podemos observar uma significativa ocorrência de STEC nos rebanhos

bovinos, principais reservatórios destas cepas. Assim, devido à proximidade de nosso Estado com a Argentina, país onde HUS é endêmica, e a falta de estudos com bovinos em nossa região, com forte característica agropecuária, nos propusemos a realizar este trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a ocorrência de marcadores de virulência e determinar os sorogrupos de isolados de *Escherichia coli* obtidas à partir de fezes de bezerros com e sem diarreia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença de genes que codificam Shiga-toxinas, Stx1 e Stx2, por PCR;
- Detectar a expressão desses genes através da produção de citotoxinas em ensaios com células Vero em cultivo;
- Determinar sorogrupos e sorotipos das amostras;
- Verificar a presença de genes que codificam fatores de colonização e outras toxinas;
- Detectar a expressão da enterohemolisina (Ehly);
- Comparar os sorotipos e perfis genotípicos e fenotípicos encontrados em animais diarréicos e não-diarréicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras fecais foram coletadas de 130 bezerros diarréicos e 103 bezerros saudáveis das raças Holtein e Holtein-Gir, durante o período de setembro de 1998 a março de 1999. Os animais pertenciam a 58 fazendas de gado leiteiro, localizadas em 19 municípios, totalizando uma área de 8.863 Km² (IBGE, 1996) na região norte do estado do Paraná, Brasil. Os bezerros tinham a idade de 3 dias a 4 meses, portanto, período de pré-desmame. Após a coleta, os *swabs* retais foram transportados em meio Cary-Blair (Difco Laboratories, Detroit, MI) em uma caixa com isolamento térmico. No laboratório, as amostras foram processadas imediatamente.

3.2 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

As amostras fecais foram semeadas em ágar MacConkey (MAC) (Difco) e ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) (Biobrás) e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Cinco colônias fermentadoras de lactose do MAC e outras cinco não-fermentadoras de sorbitol do SMAC foram selecionadas de forma aleatória. No total, 1488 colônias foram identificadas bioquimicamente como *Escherichia coli*, segundo os métodos de Toledo et al (1982a) e Toledo et al (1982b). Os isolados foram armazenados em ágar estoque e mantidos a 4°C em geladeira.

3.3 PESQUISA DE GENES PARA MARCADORES DE VIRULÊNCIA

Foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos.

3.3.1 Obtenção de DNA Bacteriano e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram cultivadas em ágar LB ou ágar triptona de soja (TSA) a 37°C por 18 a 24 horas. As colônias foram suspensas em 300µL de água ultra pura esterilizada, em tubos de microcentrífuga, levadas ao aquecimento em água fervente, por 15 minutos e imediatamente colocadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de PCR.

3.3.2 Genes pesquisados

Para a realização da reação de amplificação dos genes de interesse foram utilizados os seguintes componentes e temperaturas de reação:

- Genes *stx1* e *stx2hb*: 10 µL do lisado bacteriano, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 18 pmol (*stx1*) ou 9 pmol (*stx2hb*) de cada oligonucleotídio iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1x e água ultra pura suficiente para o volume final de 50µL.
- Genes *EhlyA*, *eaeA* e *saa*: 10 µL do lisado bacteriano, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 2,0 mM MgCl₂ (Invitrogen), 25 pmol de cada oligonucleotídio iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1x e água ultra pura suficiente para o volume final de 50µL.
- Gene *lpf₀₁₁₃*: 10 µL do lisado bacteriano, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 5,0 mM MgCl₂ (Invitrogen), 25pmol de cada oligonucleotídio iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1x e água ultra pura suficiente para o volume final de 50µL.
- Genes: K99, F41, CS31A, F17, STa, LT-II, CNFs e East-1: 7 µL do lisado bacteriano, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 50 pmol de cada oligonucleotídio iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1x e água ultra pura suficiente para o volume final de 30µL;

As seqüências dos pares de oligonucleotídios iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados, amostras padrão utilizadas como controles positivos e condições de amplificação estão descritos na Tabela 2.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 9700 PCR. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% , corados com brometo de etídio (1,5 µg/mL) e visualizados em transluminador (Eletrophoresis Power Supply CPS 600, Pharmacia Biotech). Em cada gel foi utilizado um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Invitrogen)

Tabela 2 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, cepas padrão e condições utilizadas neste

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' – 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Temperatura de anelamento	Ciclos (n)	Cepa Padrão	Referências Bibliográficas
<i>stx1</i>	(F)GAAGAGTCCGTGGGATTACG (R) AGCGATGCAGCTATTAATAA	130	55°C	30	<i>E. coli</i> EDL 933	Blanco et al., 1997
<i>stx2h^a</i>	(F) CCGTCAGGACTGTCTGAAAC (R) GAGTCTGACAGGCAACTGTC	478	55°C	30	<i>E. coli</i> EDL 933	Blanco et al., 1997
<i>EhlyA</i>	(F) GCATCATCAAGCGTACGTTTCC (R) AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	60°C	35	<i>E. coli</i> C3279	Paton e Paton, 1998.
<i>eaeA</i>	(F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	60°C	35	<i>E. coli</i> E2348	Paton e Paton, 1998.
<i>saa</i>	(F) CGTGATGAACAGGCTATTGC (R) ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	62°C	35	<i>E. coli</i> FV 965b	Paton e Paton, 1998.
<i>lpf₀₁₃</i>	(F) ATGAAGCGTTAATATTATAG (R) TTATTTCTTATATTCGAC	573	50°C	30	<i>E. coli</i> de Sp	Doughty et al., 2002

Tabela 2 – continuação

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' – 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Temperatura de anelamento	Ciclos (n)	Cepa Padrão	Referências Bibliográficas
K99	(F) TGGGACTACCAATGCTTCTG (R) TATCCACCATTAGACGGAGC	450	48°C	35	<i>E. coli</i> B41 (O101:K-)	Rosendaal et al., 1984.
F41	(F) GAGGGACCTTCATCTTTTAG (R) AGTCCATTCCATTTAATGGC	431	48°C	35	<i>E. coli</i> B41 (O101:K-)	Fidock et al., 1989.
CS31A	(F) GGGCGCTCTCTCCTTCAAC (R) CGCCTAATTGCTGGCGAC	402	48°C	35	<i>E. coli</i> 31A	Bertin et al., 1998.
F17	(F) GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG (R) CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC	537	62°C	35	<i>E. coli</i> B62	Bertin et al., 1996.
STa	(F) TCCGTGAAACAACATGACGG (R) ATAACATCCAGCACAGGCAG	244	48°C	35	<i>E. coli</i> B41 (O101:K-)	So & McCarty, 1980.
LT-II	(F) AGATATAATGATGGATATGTATC (R) TAACCCTCGAAATAAATCTC	300	48°C	35	<i>E. coli</i> Pc/c LT-II	Schultsz et al., 1994.
EAST1	(F) CCATCAACACAGTATTCCGA (R) GGTTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	50°C	35	<i>E. coli</i> FV171 (O44)	Yamamoto & Echeverria, 1996.
CNFs	(F) CTGGACTCGAGGTGGTGG (R) CTCCTGTCAACCACAGCC	533	55	35	<i>E. coli</i> B26A (O123:H16)	Blanco et al., 1996.

^a Detecta apenas Stx2 produzida por cepas de STEC isoladas de bovinos e humanos associadas com colite hemorrágica e síndrome hemolítico urêmica.

3.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA TOXINA SHIGA (STX) EM ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Foi utilizado o protocolo de Konowalchuk et al. (1977), com modificações:

- Caldo Penassay no lugar de TSB;
- Tempo de incubação das amostras e condições: 48 horas em cultivo estático ao invés de 20 a 24h sob agitação;

3.4.1 Preparo das Amostras

As amostras foram semeadas em caldo Penassay (Antibiotic Medium 3, Difco) , incubadas a 37°C durante 48 horas e centrifugadas a 3.000 rpm por 30 min. Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração, utilizando membranas com poros de 0,22µm de diâmetro e mantidos a -20°C até o momento dos testes.

3.4.2 Preparo da Linhagem Celular e Teste de Citotoxicidade

As células Vero (células de rim de macaco verde africano) foram cultivadas em garrafas com meio mínimo essencial Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas para a formação de uma monocamada celular. Após o crescimento, a monocamada celular foi desprendida com tripsina e distribuída em alíquotas de 100 µL em microplacas de fundo chato com 96 orifícios, na concentração de aproximadamente 2,5.10⁵ células/mL, visualizadas em microscópio invertido. Após 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, o meio de cultivo foi descartado e substituído pelos filtrados bacterianos diluídos (1:4) em meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e as alterações morfológicas das células foram observadas em microscópio invertido após 24, 48 e

72 horas de incubação. Os testes foram realizados em triplicata e controles positivo e negativo foram utilizados – cepas *E. coli* 5CL (amostra de origem humana, paciente com HUS, Canadá) e *E. coli* Hb101, respectivamente.

3.5 ENSAIO PARA A DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENTEROHEMOLISINA

Foi utilizado o protocolo de Beutin et al. (1989). As amostras foram semeadas em caldo TSB, incubadas a 37°C por 18 a 24 horas e semeadas em placas de ágar sangue convencional (AS - 5% sangue de carneiro em ágar tripton de soja- TSA) e ágar sangue com 5% de hemácias de carneiro lavadas em TSA, suplementado com CaCl₂ 10mM (ASHL). As placas foram incubadas a 37°C e observadas após 3, 6 e 18 horas de incubação. As amostras que apresentaram hemólise somente após 18 horas em ASHL foram consideradas produtoras de enterohemolisina. As cepas *E. coli* C3279 e *E. coli* Hb101 foram utilizadas como controles positivo e negativo neste ensaio.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS SOROGRUPOS

A determinação dos antígenos O foi realizada por uma técnica de microaglutinação em placas descrita por Guineé et al. (1972) e modificada por Blanco et al. (1992). Os antisoros (O1 a O175) foram absorvidos com os respectivos antígenos detectados por reação cruzada para a remoção das aglutininas não-específicas. Os antisoros foram produzidos no Laboratório de Antígenos Bacterianos II, Instituto de Biologia, na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.6.1 Preparação das Amostras

Para a determinação dos sorogrupos as amostras foram semeadas em TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi suspenso em salina 0,15M, na

concentração aproximada de $1,8 \cdot 10^9$ CFU/mL (escala 6 de MacFarland) e autoclavado a 121°C sob pressão por 30 minutos para a destruição dos antígenos flagelares e capsulares. Após resfriamento, as suspensões foram diluídas (v/v) com solução de violeta genciana (0,005%, p/v) em salina formolizada (0,5, v/v). As suspensões foram conservadas a 4°C e utilizadas em, no máximo, 4 semanas.

3.6.2 Reação de aglutinação em microplaca

Os ensaios de aglutinação foram realizados em microplacas de 96 poços com fundo V, utilizando um conjunto de antisoros anti-O específicos (O1 até O175). Cada poço da microplaca recebeu $50\mu\text{L}$ de amostra e $50\mu\text{L}$ de antisoro diluído (1:80). A placa foi incubada a $37^\circ\text{C}/18\text{h}$ em câmara úmida. Em cada placa foi utilizado um padrão negativo de leitura (salina e amostra). As amostras que apresentaram depósito no fundo do poço (botão) foram consideradas negativas.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS

A determinação dos antígenos H foi realizada por aglutinação em tubos utilizando um conjunto de soros anti-H (H1 a H56) produzidos no Laboratório de Antígenos Bacterianos II, Instituto de Biologia, na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.7.1 Preparação das Amostras

3.7.1.1 Ativação da motilidade

As amostras que se apresentaram móveis no meio MILi foram semeadas em meio semi-sólido (BHI, acrescido de 0,2% ágar bacteriológico) em tubos U e incubadas a

37°C/18 a 24 horas, ou até que o crescimento bacteriano alcançasse a extremidade oposta do inóculo. Este processo foi repetido por três passagens afim de estimular a expressão dos flagelos das amostras, observando-se que o repique foi obtido da extremidade do tubo oposta à inicialmente semeada.

3.7.1.2 Preparo do antígeno H

A partir do último tubo U semeado, as amostras foram semeadas em tubos com 7mL de caldo BHI e incubadas a 37°C em estufa com agitação orbital por 6 a 8 horas, em seguida inativadas pela adição de igual volume de formalina 1,0% em salina fisiológica. A turbidez obtida foi comparável ao tubo da escala 2 de MacFarland: $6,0 \cdot 10^8$ CFU/mL.

3.7.2 Aglutinação em Tubos

Em baterias de tubos de vidro 10x100 mm, foram adicionados 200 µL de diferentes antissoros, a estes foram adicionados 200 µL dos antígenos H. A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C por 3 horas. A reação foi considerada positiva quando ocorria a formação de uma película no fundo do tubo e apresentação límpida do sobrenadante, enquanto o sobrenadante turvo caracterizou a reação negativa.

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DOS GENES *STX* E EXPRESSÃO FENOTÍPICA EM CÉLULAS DA LINHAGEM VERO

Os resultados da PCR demonstraram que 83/86 (96,5%) cepas de *E. coli* isoladas de bezerros diarréicos e não-diarréicos carregavam genes *stx*. Entre as 43 cepas isoladas de animais diarréicos, 26/43 (60,5%) foram *stxI*⁺; 3/43 (7%) *stx2*⁺ e 11/43 (25,6%) *stxI*⁺ *stx2*⁺. Nos animais não-diarréicos, 20/43 (46,5%) foram *stxI*⁺; 7/43 (16,3%) *stx2*⁺ e 16/43 (37,2%) *stxI*⁺ *stx2*⁺.

Quanto à expressão *in vitro*, 14/43 (32,6%) cepas *stx*⁺ isoladas de animais não-diarréicos demonstraram citotoxicidade em células Vero: 6/20 (30%) cepas *stxI*⁺, 2/7 (28,6%) *stx2*⁺ e 7/16 (43,8%) *stxI*⁺ *stx2*⁺. Entre as cepas *stx*⁺ isoladas de animais diarréicos, 22/40 (55%) apresentaram citotoxicidade: 19/26 (73,1%) cepas *stxI*⁺, 2/3 (66,7%) *stx2*⁺ e 1/11 (9,1%) *stxI*⁺ *stx2*⁺.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS SOROGRUPOS E SOROTIPOS

Foram detectados 16 sorogrupos diferentes nas amostras. Os sorogrupos O1, O2, O7, O12, O20 e O22 foram os mais frequentes, distribuídos entre 42 isolados enquanto 27 foram considerados não-tipáveis (NT) com os antisoros disponíveis. Com exceção do sorogrupo O1, onde 7/9 (78%) dos isolados foram do grupo diarréico, não houve diferenças nas prevalências dos sorogrupos entre as cepas de animais diarréicos e não-diarréicos. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Sorogrupos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros diarréicos e não-diarréicos

Sorogrupo	Nº total de cepas	Animais	
		Diarréicos	Saudáveis
O1	9	7	2
O2	11	6	5
O4	2	0	2
O7	4	2	2
O8	3	1	3
O12	4	2	2
O15	1	0	1
O17	1	1	0
O20	4	3	1
O22	10	4	6
O30	1	0	1
O41	3	0	3
O78	1	1	0
O88	2	0	2
O126	1	0	1
O132	1	1	0
R	1	1	0
NT	27	13	14

R: Amostra rugosa

NT: Não-tipável

Dezessete antígenos H (H1, H2, H3, H6, H14, H16, H18, H19, H21, H25, H28, H32, H38, H39, H40, H48, H55) foram distribuídos entre 66 isolados enquanto 3 foram imóveis (NM) e 17 foram considerados não-tipáveis (NT). No total, 52 sorotipos diferentes foram encontrados.

4.3 DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM FATORES DE VIRULÊNCIA POR PCR

Nas cepas de *E. coli* de animais diarréicos, o gene *lpf₀₁₁₃* foi detectado em 36/43 dos isolados (83,7%); 5/43 (11,6%) foram *clpG*⁺; 3/43 (7%), *eaeA*⁺; *saa*, e *f17* foram detectados em 1/43 (2,3%) cada. As toxinas detectadas foram: East-1⁺ em 6/43 (14%); Ehly⁺ e LT-II⁺, presentes em 2/43 (4,7%) e CNFs 1/43 (2,3%)

Entre os isolados de animais não diarréicos, o gene *lpf₀₁₁₃* foi detectado em 35/43 (81,4%), 4/43 (9,3%) *saa*⁺; *f17*⁺ e *clpG*⁺ foram detectados em 3/43 (7%) cada e 1/43 (2,3%) foram *eaeA*⁺. As toxinas detectadas foram: EAST-1 em 6/43 isolados (14%); Ehly⁺ em 4/43 (9,3%); LT-II⁺ em 3/43 (7%) e 2/43 (4,7%) foram CNFs⁺.

Entre os 86 isolados de *E. coli*, nenhuma cepa foi *k99*⁺, *sta*⁺ ou *f41*⁺.

Todos os isolados Ehly⁺, exceto um do grupo diarréico, produziram enterohemolisina, detectada em placas de ágar sangue com hemácias de carneiro lavadas.

Os principais perfis genotípicos e fenotípicos dos grupos diarréicos e não-diarréicos estão descritos nas Tabelas 4 e 5, sendo os mais frequentes *stx1*; *stx1*, *lpf₀₁₁₃* e *stx1*, *stx2*, *lpf₀₁₁₃*, tanto nas amostras diarréicas quanto nas amostras não-diarréicas.

Tabela 4 – Sorotipos e principais perfis genotípicos e fenotípicos dos isolados de bezerros diarréicos

Animal	Sorotipo	Perfil Genotípico	Perfil Fenotípico
1	O78:H2	<i>stx1, Ehly, eaeA</i>	Stx
2	O2:H40	<i>stx1, lpf</i>	Stx
	O1:H32	<i>stx2</i>	Stx
3	O1:H32	<i>stx1, lpf</i>	Stx
4	O132:H18	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O7:H55	<i>stx1, lpf</i>	Stx
5	O7:HNT	<i>stx1, east1, lpf</i>	Stx
	R:H48	<i>stx1+stx2,east1, lpf</i>	-
6	O8:HNT	<i>stx1+stx2,Ehly, lpf</i>	Ehly
	O2:H19	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
7	O4:H21	<i>stx1+stx2, lpf</i>	Stx
	O22:HNM	<i>stx1, lpf</i>	Stx
8	O1:H32 *	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
9	O1:H1	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O1:H1	<i>stx1, lpf</i>	Stx
10	O22:H48	<i>stx1+stx2,east1, lpf</i>	-
11	ONT:H25	<i>stx1, eaeA</i>	Stx
	ONT:H21	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O12:H1	<i>stx1, eaeA</i>	Stx
12	O2:HNT	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O2:HNT	<i>stx2, lpf</i>	Stx
	O22:HNT	<i>stx2, lpf</i>	-
13	O20:H14 *	<i>stx1, lpf</i>	Stx
14	O20:H28	<i>lpf</i>	-
15	ONT:H21	<i>lpf</i>	-
16	O12:H25	<i>lpf</i>	-
17	O12:H1	<i>stx1, lpf</i>	Stx
	ONT:HNT	<i>stx1, lpf</i>	Stx
18	O2:H55	<i>stx1</i>	Stx
	ONT:H25	<i>stx1</i>	Stx
19	O22	<i>stx1, lpf</i>	Stx
	ONT:H6 *	<i>stx1, lpf</i>	Stx
21	O17:H18	<i>stx1, cs31a, east1, lpf</i>	Stx
22	O1:H32	<i>stx1, cs31a, east1, lpf</i>	-
	ONT:H6	<i>stx1, cs31a, lpf</i>	-
23	ONT:HNT	<i>stx1, cs31a,, lpf</i>	-
	ONT:H21	<i>stx1, cs31a, east1, lpf</i>	-
	ONT:H32	<i>stx1, lpf</i>	-
24	ONT:H16	<i>stx1</i>	-
	ONT:H25	<i>stx1, lpf</i>	-

* São duas cepas com as mesmas características.

NT: Não-tipável NM: Cepa imóvel

Tabela 5 – Sorotipos e principais perfis genotípicos e fenotípicos dos isolados de bezerrões não-diarreicos

Animal	Sorotipo	Perfil Genotípico	Perfil Fenotípico
1	O2:H6	<i>stx1, cs31a, Ehly, eaeA, lpf</i>	Stx, Ehly
2	ONT:HNM	<i>stx1, cs31a, lpf</i>	-
	ONT:HNM	<i>stx1+stx2, cs31a, lpf</i>	Stx
3	O2:H6	<i>stx1+stx2, east1</i>	-
4	O4:H48	<i>stx1, east1, lpf</i>	-
5	ONT:H25	<i>stx1+stx2</i>	Stx
6	O20:HNT	<i>stx1, lpf</i>	Stx
	O7:HNT	<i>stx2, east1</i>	Stx
7	O2:H25	<i>stx1</i>	Stx
	ONT:H25	<i>stx1+stx2</i>	-
8	O22:H48	<i>stx1, east1, lpf</i>	Stx
	O22:H48	<i>stx1+stx2, lpf</i>	Stx
	O2:HNT	<i>stx1+stx2, lpf</i>	Stx
9	O12:H2	<i>stx1, Ehly, lpf</i>	Stx, Ehly
10	O22:HNT	<i>stx1, lpf</i>	Stx
	O2:H18	<i>stx1+stx2, saa, lpf</i>	-
11	O1:H6	<i>stx1, lpf</i>	-
12	O41:H55	<i>stx1, lpf</i>	-
	ONT:H21	<i>stx2, lpf</i>	-
13	ONT:H48	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O15:HNT	<i>stx1, lpf</i>	-
	ONT:H55	<i>stx2, lpf</i>	-
14	O22:H19	<i>stx1, lpf</i>	-
	O4:H19	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O22:H3	<i>stx2</i>	-
15	ONT:H3	<i>stx1+stx2, saa, Ehly lpf</i>	Stx, Ehly
	O126:H16	<i>stx1</i>	-
16	ONT:HNT *	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
17	O8:H16	<i>stx1, east1, saa, lpf</i>	-
18	ONT:H39	<i>stx1, lpf</i>	-
19	O8:H48	<i>stx2, lpf</i>	-
	ONT:H48	<i>stx1</i>	-
	ONT:H48	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
20	O22:H48	<i>stx2, lpf</i>	Stx
	O30:H38	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-
	O7:HNT	<i>stx1, lpf</i>	-
21	O88:H38	<i>stx2, saa, Ehly, lpf</i>	Ehly
22	O88:H25	<i>stx1, lpf</i>	-
	O1:H1	<i>stx1+stx2, lpf</i>	Stx
23	ONT:HNT	<i>stx1+stx2, east1, lpf</i>	-
24	O41:H48	<i>stx1, lpf</i>	-
	O41:HNT	<i>stx1+stx2, lpf</i>	-

* São duas cepas com as mesmas características.

NT: Não-tipável NM: Cepa imóvel

5 DISCUSSÃO

A colibacilose bovina é uma importante causa de mortalidade e retardo no crescimento de animais jovens, levando a perdas econômicas significativas. Bezerros podem ser colonizados por cepas patogênicas de *E. coli* e não desenvolver a doença, assim estes animais podem ser considerados reservatórios destas cepas, potencialmente patogênicas também para humanos (Urdahl et al, 2003, Moreira et al, 2003). No Brasil, alguns trabalhos relataram o isolamento e a caracterização de STEC em bovinos (Cerqueira et al, 1999; Guth et al, 2003; Leomil et al, 2003; Moreira et al, 2003; Salvadori et al, 2003; Irino et al, 2005), representando uma pequena amostragem do rebanho brasileiro. A falta de dados sobre os fatores de virulência necessários para a colonização e desenvolvimento da colibacilose bovina e sobre os sorotipos prevalentes dificulta a compreensão sobre esta doença, justificando a realização de estudos que tentem preencher esta lacuna.

Neste trabalho, utilizamos métodos moleculares e fenotípicos para a caracterização das amostras de *E. coli* isoladas de bovinos, buscando genes que codificam fatores de virulência, considerados relevantes na literatura nacional e internacional, bem como a expressão fenotípica de alguns destes genes e a determinação dos sorotipos prevalentes.

Nossos resultados demonstraram que o gene que codifica a toxina Stx1 foi o mais frequentemente detectado pela PCR, tanto em animais diarreicos (60,5% dos isolados) quanto em animais não-diarreicos (46,5% dos isolados), seguido de *stx1+stx2* (25,6% dos diarreicos e 37,2% dos não-diarreicos) e *stx2*. Perfil semelhante foi relatado por Guth et al (2003) em cepas não-O157. A expressão fenotípica de *stx* não ocorreu em todas as amostras submetidas ao ensaio de citotoxicidade, no entanto, ocorreu com maior frequência nos isolados diarreicos, sugerindo a maior virulência destas amostras.

O gene que codifica a enterohemolisina, *Ehly*, foi detectado em apenas 6 das 83 amostras, divergindo do resultado esperado, pois, segundo a literatura, STEC está fortemente associada à presença de enterohemolisinas (Beutin et al, 1989; Holland et al, 1999; Irino et al, 2003). Tanto a detecção do gene, quanto a expressão fenotípica em placas de ágar sangue foi maior nos isolados não-diarreicos.

A toxina EAST-1 foi detectada em 8 amostras do total de 86, representando 14% e 4,7% das amostras diarreicas e não-diarreicas, respectivamente. O gene *astA* é plasmidial e parece ter sido adquirido por outras classes de DEC: Savarino et al. (1996) mostraram a presença desse gene em 100% das amostras de EHEC O157:H7 analisadas, 41%

de ETEC e 22% de EPEC. O fator de colonização CS31A, associado à colibacilose bovina, foi detectado em 11,6% e 7% das amostras diarréicas e não-diarréicas, respectivamente. Cinquenta por cento das amostras diarréicas e nenhuma das não-diarréicas CS31A positivas também o foram para EAST-1, associação relatada por Bertin et al (1998).

Os genes que codificam os fatores citotóxicos necrotizantes, foram pesquisados pela PCR com o uso de oligonucleotídeos iniciadores que detectam ambas as variantes, 1 e 2, denominado CNFs (Blanco et al., 1996).. Embora o papel de cepas de NTEC na patogênese da diarréia bovina ainda seja controverso (Oswald et al., 1991; Blanco et al 1993; Blanco et al 1998; Burns et al 1996), encontramos maior número de isolados *cnfs* positivos nas amostras diarréicas (14%) do que nas amostras-não diarréicas (2,3%).

Das toxinas associadas às cepas de ETEC, STa é a enterotoxina mais comumente associada à colibacilose bovina, enquanto a variante II da toxina LT, LT-II, não tem sua capacidade de causar diarréia comprovada, embora tenha sido encontrada em cepas de ETEC isoladas de bezerros diarréicos (Nagy & Fekete, 1999). Em nosso trabalho, a ausência de STa e das adesinas K99 e F41 indicam amostras não-enterotoxigênicas, pois estes fatores de virulência são característicos deste patotipo (Blanco & Blanco, 1993). A presença de LT-II em 5 do total de 86 amostras pode ser explicada pela transferência horizontal de genes, pois este grupo de toxinas é codificada por genes plasmidiais (O'Brien & Holmes, 1986).

O gene *eaeA* foi encontrado em apenas 4 do total de 86 amostras, sugerindo o papel de outras adesinas na colonização de bovinos por STEC. De fato, em nosso estudo, o gene *lpf_{O113}*, que codifica a fímbria polar longa, LPF, foi detectado em mais de 80% dos isolados, confirmando a associação proposta por Osek et al (2003) entre a presença deste marcador e a ausência da região LEE, em cepas não-O157:H7. Outra adesina descrita em cepas LEE-negativas isoladas de bovinos, Saa (Paton et al, 2001), foi detectada em 2,3 e 9,3% das amostras diarréicas e não-diarréicas, um resultado condizente com a também baixa frequência do gene *Ehly*, pois ambos os genes costumam estar no mesmo megaplasmídeo (Paton et al, 1999).

Dos 16 sorogrupos encontrados, 7 (O2, O4, O8, O20, O22, O41, O126) estão entre os mais frequentemente encontrados em STEC isolados de bovinos. Dentre estes 7 sorogrupos, 4 (O2, O4, O20, O22, O88) estão entre os mais comumente encontrados em STEC isolados de bovinos, em diferentes países, segundo Blanco et al (2006a). Os sorogrupos O15 e O78 também foram descritos como cepas STEC de bovinos na Espanha (Blanco et al, 1997) e na Tailândia (Panutdaporn et al, 2004). Os sorogrupos prevalentes nas amostras

diarréicas e não-diarréicas foram O1, O2 e O22, destacando-se a presença de O1 em 7 animais diarréicos e em apenas 2 animais não-diarréicos.

Cinquenta e dois sorotipos foram detectados, sendo 7 descritos como STEC isolados de bovinos: O2:H25, O8:H16, O17:H18, O22:HNM, O88:H25 e O132:H18 (Blanco et al., 2006a). Os sorotipos O1:H1, O2:H6, O17:H18 e O88:H25 também são descritos como STEC isolados de humanos (Piérard et al, 1992; Blanco et al, 2006b). Uma grande diversidade de sorotipos foi encontrada, se comparada a um trabalho anterior, realizado no Brasil com amostras isoladas de gado de corte (Leomil et al, 2003). No entanto, uma maior diversidade de sorotipos encontrada em isolados de gado leiteiro, em comparação ao gado de corte, foi relatada por Cerqueira et al (1999) e, mais recentemente, por Irino et al (2005).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que bezerros saudáveis e diarréicos podem ser considerados reservatórios de cepas de STEC. Sorogrupos isolados também de amostras humanas foram encontrados, o que pode ser considerado um risco para a saúde pública.

6 CONCLUSÕES

- Nossos resultados demonstraram que o gene que codifica a toxina Stx1 foi o mais freqüentemente encontrado, tanto em animais diarréicos (60,5% dos isolados) quanto em animais não-diarréicos (46,5% dos isolados);
- Dos 16 sorogrupos encontrados, 7 (O2, O4, O8, O20, O22, O41, O126) estão entre os mais freqüentemente encontrados em STEC isolados de bovinos. Dentre estes 7 sorogrupos, 4 (O2, O4, O20, O22, O88) estão entre os mais comumente encontrados em STEC isolados de bovinos, em diferentes países, segundo Blanco et al (2006a);
- Os sorogrupos prevalentes nas amostras diarréicas e não-diarréicas foram O1, O2 e O22, destacando-se a presença de O1 em 7 animais diarréicos e em apenas 2 animais não-diarréicos;
- Cinquenta e dois sorotipos foram detectados, sendo 7 descritos como STEC isolados de bovinos: O2:H25, O8:H16, O17:H18, O22:HNM, O88:H25 e O132:H18 (Blanco et al., 2006a);
- Os fatores de virulência F41, K99 e STa não foram identificados, portanto os isolados de *E. coli* não pertencem à classe ETEC;
- Considerando os itens anteriormente mencionados, concluímos que o aumento de cepas ONT e HNT sugerem uma provável evolução, decorrente de alterações na estrutura do lipopolissacáride bacteriano (LPS) e dos flagelos, levando ao aparecimento de cepas antigenicamente novas;
- Além disso, não observamos diferenças na freqüência de diferentes marcadores de virulência entre cepas de animais diarréicos e cepas de animais não-diarréicos, confirmando o papel de bovinos como reservatório de STEC.

REFERÊNCIAS

- ACRES, S. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **J. Dairy Sci.** 68:662-668. 1985.
- ALONSO, P., BLANCO, J., BLANCO M., GONZÁLEZ, E. A. Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infection: relationship with haemagglutination. **FEMS Microbiol. Lett.** 48:391-396.1987.
- BANATVALA, N., GRIFFIN, P. M., BARRETT. T. J., GREENE, K. D., BIBB, W. F., GREEN, WELLS, J. G. e colaboradores de H.U.S.S. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. **J. Infect. Dis.** 183:1063-1070. 2001.
- BAUMLER, A. J., HELFROM, F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 177:2087-2097. 1995.
- BAUNDRY, B., SAVARINO, S. J., VIAL, P., KAPER, J. B., LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.** 161:1249-1251. 1990.
- BERTIN, Y., MARTIN, C., OSWALD, E., GIRARDEAU, J. P. Rapid and specific detection of F17 related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2921-2928. 1996.
- BERTIN, Y., MARTIN, C., GIRARDEAU, J. P., POHL, P., CONTREPOIS, M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST-1 toxin among CNF-1 producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. **FEMS Microbiol. Lett.** 162:235-239. 1998.
- BEUTIN, L., MONTENEGRO, M. A., ORSKOV, I., ORSKOV, F., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 27:2559-2564. 1989.
- BEUTIN, L., ALEKSIC, S., ZIMMERMANN. S., GLEIER, K. Virulence factors and phenotype traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans patients in Germany. **Med. Microbiol. Immunol.** 183:13-21. 1994.

- BILGE, S. S., APOSTOL., J. M., FULLNER, K. J., MOSELEY, S. L. Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 7:993-1006. 1993.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., ALONSO, M. P., BLANCO, J. E., GARABAL, J. I., GONZÁLEZ, E. A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiol. Lett.** 96:155-16.1992.
- BLANCO, M., BLANCO, J., BLANCO, J. E. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Am. J. Vet. Res.** 54:1446-1451.1993.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSANOBRE, C.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; JUÁREZ, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **J. Microb. Meth.** 26: 95-101. 1996.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., BLANCO, J., MORA, A., PRADO, C., ALONSO, M. P., MOURIÑO, M., MADRID, C., BALSALOBRE, C., JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxi-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Vet. Microbiol.** 54:309-319. 1997.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A., BLANCO, J. Distribution and characterization of faecal necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1 and CNF2 isolated from healthy cows and calves. **Vet. Microbiol.** 59:183-192.1998.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A., DHABI, G., ALONSO, M. P., GONZÁLEZ E. A., BERNARDEZ, 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*). **J. Clin. Microbiol.** 42:645-651. 2004.
- BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A., ALONSO, M. P., GONZÁLEZ, E. A., BERNARDEZ, M. I. O:H serotypes of bovine verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC). 2006a. Disponível em < <http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTIPOBOVS.htm>>. Acessado em 20/02/2006.
- BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A., ALONSO, M. P., GONZÁLEZ, E. A., BERNARDEZ, M. I. O:H serotypes of human verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC). 2006b. Disponível em < <http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTIPOBOVS.htm>>. Acessado em 25/02/2006.

BLOOD, D. C., HENDERSON, J. A., RADOSTITIS, O. M. **Clin. Vet.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 446-511. 1983.

BRASIL, Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP. Manual das doenças transmitidas por alimentos. <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ecolinet.htm>. 2001.

BRUNDER, W., SCHMIDT, H., KARCH, H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiol.** 142:3305-3315. 1996.

BRUNDER, W., SCHMIDT, H., KARCH, H. Esp P, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiol.** 24:767. 1997.

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* ONT:H19 of bovine origin. **J. Clin. Microbiol.** 41:2106-2112. 2003.

BURNS, A. L. BALL, H. J., FINLAY, D. A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. **Vet. Microbiol.** 49:235-241. 1996.

CALDERWOOD, S. B., ACHESON, D. W. K., KEUSCH, G. T., BARRETT, T. J., GRIFFIN, P. M., STOCKBINE, N. A., SWAMINATHAN, B., KAPER, J. B., LEVINE, M. M., KAPLAN, B. S., KARCH, H., O'BRIEN, A. D., OBRIG, T. G., TAKEDA, Y., TARR, P. I., Wachsmuth, I. K. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News** 62:118-119. 1996.

CAMPOS, L. C., FRANZOLIN, M R., TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. **Mem. Inst. O. Cruz.** 99:545-552. 2004.

CENTER for Diseases Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-selected sites. United States. **Morb. Mortal. Skly. Rep.** 53:338-343. 2004.

CERQUEIRA, A. M. F., TIBANA, A, GUTH, B. E. C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. **J. Food Protect.** 60:177-180. 1997.

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

CORNICK, N. A., BOOHER, S. L., MOON, H. W. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. **Infect. Immun.** 70:2704-2707. 2002.

DE RICKE, J., GONZÁLEZ, E. A., BLANCO, J., OSWALD, E., BLANCO, M., BOIVIN, R. Evidence of two types of cytotoxic necrotizing factor in humans and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 28:694-699. 1990.

DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., MOON, H. W., O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. **Infect. Immun.** 66:4560-4563. 1998.

DOUGHTY, S., SLOAN, J., BENNETT-WOOD, V., ROBERTSON, M., ROBINS-BROWN, R. M., HARLAND, E. L. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 70:6767-6769. 2002.

DUFFY, G., GARVEY, P., MCDOWELL, D. A. Nomenclature of verocytotoxins . In: *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Ed Duffy, G., Garvey, P., McDowell, D. A. pp: 447-452. Trumbull, Ct: Food and Nutrition Press, Inc., 2001.

ELDER, R. O., KEEN, J. E., SIRAGUSE, 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97:2999-3003. 2000.

EMBRAPA Gado de Corte Divulga. Nº 34. 1999.

FIDOCK, D. A., MENICHOLAS, P. A., LEHRBACH, P. R. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli* B41. **Nucl. Acids. Res.** 17:2849-2849. 1989.

FRANCK, S. M., BOSWORTH, B. T., MOON, H. W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. **J. Clin. Microbiol.** 36:1795-1797. 1998.

GARCIA, A., RUIZ-SANTA-QUITÉRIA, J. A., ORDEN, J. A., DE LA FUENTE, R. Diarrea neonatal del ternero: factores etiologicos. **Prod. Animal.** 147:19-37. 1999.

GIRARD, F., BATHISSON, I., FRANKEL, G. M., HAREL, J., FAIRBROTHER, J. M. Interaction of enteropathogenic and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and tir in adherence. **Infect. Immun.**, 73: 6005-6016. 2005.

GUINEÉ, P. A. M., AGTERBER, C. M., JANSEN, W. H. *Escherichia coli* O typing by means of a mechanized microtechnique. **Appl. Microbiol.** 24:127-131. 1972.

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

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

GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **Cab. Int.** p 666. 1994.

HOLLAND, R. E., WILSON, R. A., HOLLAND, M. S., GURKAN, V. Y., MULLANEY, T. P., WHITE, D. G. Characterization of *eae+* *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. **Vet. Microbiol.** 66:251-263. 1999.

IBGE, 1996. Censo Agropecuário. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IRINO, K., VAZ, T. M. I., KATO, M. A. M. F., NAVES, Z. V. F., LARA, R. R., MARCO, M. E., C. M., ROCHA, M. M. M., MOREIRA, T. P., GOMES, T. A. T., GUTH, B. E. C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 8:446-447. 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. **Vet. Microbiol.** 105:29-36. 2005.

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

JAEGER, J. L., ACHESON, D. W. Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Curr. Infect. Dis. Rep.** 2:61-67. 2000.

JENKINS, C., PERRY, N., T., CHEASTY, T., SHAW, D. J., FRANKEL, G., DOUGAN G., GUNN, G., J., SMITH, H. R., PATON, A. W., PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **J. Clin. Microbiol.** 41:1775-1778. 2003.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87:7839-7843. 1990.

KOBAYASHI, R. K. T., SARIDAKIS, H. O., DIAS, A., M. G., VIDOTTO, M. C. Molecular identification of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 31:275-280. 2000.

KOCH, C., HERTWIG, S., LURZ, R., APPEL, B., BEUTIN, L. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx_{1Ox3}* gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheeps and humans. **J. Clin. Microbiol.** 39:3992-3998. 2001.

KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J. L., STARVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 18:775-779. 1977.

LEOMIL, L., AIDAR-UGRINOVICH, L., GUTH, E. E. C., IRINO, K., VETTORATO, M. P., ONUMA, D. L., CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.** 97:103-109.2003.

LEVINE, M. M., XU, J., KAPER, J. B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WASCHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **J. Infect. Dis.** 156:175-182. 1987.

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*. **Infect Immun.** 73(5): 3063–3071. 2005.

MAINIL, J. Shiga/verocytotoxins and shiga/verocytotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Vet. Res.** 30:235-257. 1999.

MAINIL, J. G., DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animal, humans and foods: who's who? **J. Appl. Microbiol.** 98:1332-1344. 2005.

MCDANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DONNEMBERG, M. S., KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Procl. Natl. Acad. Sci. USA** 92:1664-1668. 1995.

MEAD, P. S., GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet** 352:1207-1212.1998.

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**5:607-625. 1999.

MELTON-CELSEA, A. R., O'BRIEN, A. D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin producing *E. coli* strains. Ed Kaper, J. B. & O'Brien, A. D. pp121-128. Washington, DC: ASM Press. 1998.

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

NAGY, B., FEKETE, P. Zs. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animals. **Vet. Res.** 30:259-284. 1999.

NAGY, B., FEKETE, P. Zs. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **Int. J. Med. Microbiol.** 295:443-454. 2005.

NATARO, J. P., KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:142-201. 1998.

NUNES, E. B., SARIDAKIS, H. O., IRINO, K., PELAYO, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **J. Med. Microbiol.** 52:499-504. 2003.

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

O'BRIEN, A. D., HOLMES, R. K. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press. Washington, DC. Pp 2788-2802. 1986.

O'BRIEN, A. D, HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.** 51:206-220. 1987.

ORDEN, J. A., RUIZ-SANTA-QUITÉRIA, J. A., CID, D., GARCÍA, S., DE LA FUENTE, R. Prevalence and characteristic of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. **Vet. Microbiol.** 66:265-273. 1999.

OSEK, J., WEINER, M., HARTLAND, E. L. Prevalence of *lpf₀₁₁₃* gene cluster among *Escherichia coli* isolates from different sources. **Vet. Microbiol.** 96:259-266. 2003.

OSWALD, E., De RICKE, J., LINTERMANS, P., VAN MUYLEM, K., MAINIL, J., DAUBE, G., POHL, P. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 29:2522-2527. 1991.

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 Shigatoxicogenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. **Vet. Microbiol.** 100:3-9. 2004.

PANUTDAPORN, N., CHONGSA-NGUAN., M., NAIR, G. B., RAMAMURTHY, T., YAMASALI, S., CHAISRI, U., TONGTAWA, P., EAMPOKALARP, B., TAPCHAI SRI, p., SAKOLVAREE, Y., KURAZONO, H., THEIN, W. B., HAYASHI, H., TAKEDA, Y., CHAIMCUMPA, W. Genotypes and phenotypes of Shiga toxin-producing-*Escherichia coli* from healthy cattle in Thailand. **J. Infect.** 48:149-160. 2004.

PATON, J. C., PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Siga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:450-479. 1998.

PATON, J. C., PATON, A. W. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb₀₁₁₁* and *rfb₀₁₅₇*. **J. Clin. Microbiol.** 36:598-602. 1998b.

PATON, A. W., WOODROW, M. C., DOYLE, R. M., LANSER, J. A., PATON, J., C. Molecular characterization of a Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible of a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.** 37:3357-3361. 1999.

- PATON, A. W., SRIMANOTE, P., WOODROW, M. C., PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.** 69:6999-7009. 2001.
- PIÉRARD, D., VAN ETTERIJCK, R., BREYNAERT, J., MORIAU, L., LAUWERS, S. Results of screening for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in faeces in Belgium. **Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.** 9:198-201. 1990.
- RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B., WELLS, J. G., DAVIS, B. R., HEBERT, R. J., OLCOTT, E. S., JOHNSON, L. M., HARGRETT, N. T., BLAKE, P. A., COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New Engl. J. Med.** 308:681-685. 1983.
- RILEY, L. W. The epidemiological, clinical and microbiologic features of haemorrhagic colitis. **Ann. Rev. Microbiol.** 41: 383-407. 1987.
- ROSENDAAL, B., GAASTRA, GRAAF, F. K. The nucleotide sequence of the genes encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 22:253-258. 1984.
- 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. **Braz. J. Microbiol.** 34:230-235. 2003.
- SANSONETTI, P. J., KOPECKO, D. J., FORMAL, S. B. *Shigella sonnei* plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. **Infect Immun.** 34:75-83. 1981.
- SANZ, M. E., VIÑAS, M. R., PARMA, A. E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. **Eur. J. Epidemiol.** 14:399-403. 1998.
- SARIDAKIS, H. O., EL GARED, S. A., VIDOTTO, M. C., GUTH, B. E. C. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Vet. Microbiol.** 54:145-153. 1997.
- SAVARINO, S. J., FASANO, A., WATSON, J., MARTIN, B. M., LEVINE, M. M., GUANDALINI, S., GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable enterotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:3093-3097. 1993.

SAVARINO, S. J., MCVEIGH, A., WATSON, J., CRAVIOTO, A., MOLINA J., ECHEVERRIA, P., BHAN, M. K., LEVINE, M. M., FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 173:1019-1022. 1996.

SCHMIDT, H., KARCH, H., BEUTIN, L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. **FEMS Microbiol. Lett.** 117:189-196. 1994

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

SCHULTSZ, C., POOL, G. J., VAN KETEL, VAN KETEL, R., DE WEVER, B., SPEELMAN, P., DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in stool samples by using nonradioactively oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.** 32:2393-2397. 1994.

SO, M., MCCARTHY, B. J. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:4011-4015. 1980.

SUSSMAN, M. The virulence of *Escherichia coli*. **Soc. Gen. Microbiol.** Academic Press, London, 1985.

THORPE, C. M., RITCHIE, J. M., ACHESON, D. W. K. Enterohemorrhagic and other Shiga toxin producing *Escherichia coli*. In *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Ed Donnenberg, M. S. pp119-154. San Diego, CA, USA: Academic Press. 2002.

TOLEDO, M. R. F., FONTES, C. F., TRABULSI, L. R. EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofanodesaminase. **Rev. Microbiol.** 13:309-315. 1982a.

TOLEDO, M. R. F., FONTES, C. F., TRABULSI, L. R. Mili – um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.** 13:230-235. 1982b.

TRABULSI, L. R., KELLER, R., GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 8:508-513. 2002.

URDAHL, A.M, BEUTIN, L., SKJERVE, E., ZIMMERMANN, S., WASTESON, Y. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. **J.Appl. Microbiol.** 95: 92–101. 2003.

VAN, DIEMEN, P. M., DZIVA, F., STEVENS, M. P., WALLIS, T. S. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H⁻ genes required for intestinal colonization in calves. . **Infect. Immun.**, 73: 1735-1743. 2005

VERWEYEN, H. M., KARCH, H., BRANDIS, M., ZIMMERHACKL, L. B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. **Pediatr. Nephrol.** 14:73-83. 2000.

YAMAMOTO, T., ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.** 64:1441-1445. 1996.

ZHANG, W., BIELASZEWSKA, M., KUCZIUS, P., KARCH, H. Identification, characterization and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.** 40:1441-1446. 2002.

ANEXO

ANEXO

***Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC): PRINCIPAIS FATORES
DE VIRULÊNCIA E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

**SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli* (STEC): PRINCIPAL VIRULENCE
FACTORS AND EPIDEMIOLOGY**

Ariane Mayumi Saito Bertão¹, Halha Ostrensky Saridakis¹

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

Resumo

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é um importante patógeno veiculado por alimentos, principalmente produtos derivados de carne bovina e está associado a quadros de diarreias leves a severas e sanguinolentas. Em alguns indivíduos, a infecção por STEC pode progredir para a síndrome hemolítico-urêmica (HUS), seqüela caracterizada pela falência renal e a púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), com possível envolvimento do sistema nervoso central. O gado bovino, geralmente saudável, é o principal reservatório de STEC, embora estas cepas também foram isoladas de outros animais domésticos: ovelhas, cabras, cães, gatos e suínos. A principal característica de virulência, a produção de toxinas Shiga, não é suficiente para causar doenças e outros fatores são considerados relevantes, como a produção de enterohemolisina e de adesinas fimbriais e afimbriais. Embora as doenças humanas associadas a STEC sejam pouco descritas no Brasil, podemos observar uma significativa ocorrência destas cepas nos rebanhos bovinos, bem como a correlação entre sorotipos encontrados nestes animais e em pacientes humanos.

Palavras-chave: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), diarreia, bovinos, fatores de virulência.

Abstract

Shiga toxin producing *Escherichia coli* is an important food borne pathogen, mainly beef products and is associated to mild and severe bloody diarrhea. In some individuals, STEC infection can progress to hemolytic uremic syndrome (HUS), a sequela characterized by renal failure, and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), with possible central nervous system involvement. Cattle, usually healthy, is the principal reservoir of STEC, however these strains were also isolated from other domestic animals: sheeps, goats, dogs, cats and pigs. The principal virulence feature, the production of Shiga toxins, is not enough to cause disease and other factors are considered important, as enterohemolysin and fimbrial and afimbrial adhesins production. Although human diseases associated to STEC have not frequently reported in Brazil, their presence is frequent in cattle, as well as correlation between serotypes found in these animals and human patient.

Keywords: Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC), diarrhea, cattle, virulence factors.

Introdução

Escherichia coli foi descrita em 1885 como uma bactéria componente da microbiota intestinal por T. Escherich, que a denominou *Bacterium coli commune* (ROBINS-BROWNE, 1987). Somente em 1945, entretanto, essa bactéria foi definitivamente associada à diarreia infantil por Bray, e por ele denominada *Bacterium coli neapolitanum*. Esse fato também comprovado por outros pesquisadores (GILES & SANGSTER, 1948; SMITH, 1949).

E. coli é classificada sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica: antígenos O ou somáticos para os sorogrupos e antígenos flagelares ou H para os sorotipos. Podem, ainda, expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogênese (Campos et al., 2004). Este esquema, O:H:K, estabelecido por Kauffmann em 1947, possibilitou um grande avanço na identificação de *E. coli* e, aplicando este sistema, verificou-se que *Bacterium coli neapolitanum* pertencia ao sorogrupo O111.

E. coli produtora de toxina Shiga (STEC) está relacionada a um amplo espectro de doenças humanas, que compreende desde diarreias leves à colite hemorrágica (HC) e a síndrome hemolítico-urêmica (HUS, cuja possível seqüela mais grave é a falência renal) e púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) em seres humanos (NATARO & KAPER, 1998; GRIFFIN & TAUXE, 1991). Humanos podem ser infectados por STEC ao ingerir alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne bovina, o que tornou esta categoria de *E. coli* objeto de estudos na medicina humana, veterinária e na biologia molecular (MAINIL & DAUBE, 2005).

A proposta desta revisão é apresentar a história e as definições de STEC, descrevendo os fatores de virulência destas cepas e dados epidemiológicos do Brasil e de outros países.

História e Definições

O reconhecimento de STEC como uma classe de *E. coli* patogênica distinta foi o resultado de duas linhas de estudo convergentes: A primeira iniciou-se quando a capacidade de certas cepas de *E. coli*, pertencentes aos sorogrupos O18, O26, O111, O126 e O128, de produzir toxinas que causavam efeito citopático irreversível em células Vero (células de rim de macaco verde africano), foi descrita

pela primeira vez por Konowalchuk et al em 1977, surgindo o termo verotoxina ou verocitotoxina. Neste trabalho, das 10 cepas citotóxicas, 3 foram isoladas de leitões acometidos com a doença do edema e 7 de crianças com diarreia, sugerindo o envolvimento desta nova citotoxina na patogênese de doenças gastrintestinais (KONOWALCHUCK et al., 1977). Em 1982, O'Brien et al descreveram a capacidade de certas cepas de EPEC em produzir uma citotoxina letal para células HeLa. Assim como a toxina de Shiga, esta inibia a síntese protéica em células HeLa, era enterotóxica para intestino de coelho e letal para camundongos. Por apresentar essas características, foi chamada toxina Shiga-like. As nomenclaturas "VTEC/verotoxina" passaram a ser utilizadas, principalmente, por pesquisadores canadenses, enquanto os termos "SLTEC/ SLT" foram adotados por pesquisadores americanos. Em 1996, Calderwood et al propuseram a nomenclatura toxina Shiga/*E. coli* produtora de toxina Shiga (Stx/STEC), devido ao alto grau de homologia estrutural e funcional da toxina de *E. coli* com a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

A segunda via teve início em 1983, com o relato de que um raro sorotipo de *E. coli*, O157:H7, seria responsável por um surto de diarreia sanguinolenta, ligado ao consumo de hambúrgueres contaminados e mal-cozidos. Este quadro clínico foi denominado colite hemorrágica (HC) (RILEY et al., 1983). Subseqüentemente, O'Brien e La Veck (1983) purificaram SLT e demonstraram que a toxina Shiga produzida por *S. dysenteriae* tipo 1 e SLT (*E. coli* cepa H30, da coleção de Konowalchuck) eram idênticas, tanto em suas características bioquímicas como atividades biológicas. Em outro trabalho, O'Brien et al. (1983) que a cepa de *E. coli* sorotipo O157:H7 descrita por Riley (1983) também a produzia. Nos anos seguintes, *E. coli* O157:H7 foi associada a quadros de diarreia leves a severas e sanguinolentas, com seqüelas em alguns pacientes como a síndrome hemolítico-urêmica (HUS), que pode levar à falência renal (Karmali et al., 1983) e a púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), com possível envolvimento do sistema nervoso central. Devido à associação inicial de O157:H7 com colite hemorrágica, as cepas pertencentes a este sorotipo foram denominadas *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) e, por muitos anos, EHEC permaneceu como sinonímia de *E. coli* O157:H7, agente etiológico de HC. Atualmente, o termo STEC é utilizado para caracterizar cepas de *E. coli* produtoras de Stx, enquanto EHEC caracteriza cepas de *E. coli* que produzem Stx e

formam uma lesão histopatológica (*attaching and effacing*, A/E) (MAINIL & DAUBE, 2005). As cepas de STEC também são denominadas EHEC LEE-negativas ou eae-negativas (LUCK et al, 2005).

Fatores de virulência

Os mecanismos pelos quais STEC causam HC e HUS não foram totalmente elucidados. A mais importante característica de virulência, a produção de uma ou mais toxinas Shiga, isoladamente, não é suficiente para causar doenças e outros fatores são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais (NATARO & KAPER, 1998; PATON & PATON, 1998).

Toxinas Shiga

Ensaio imunológico de neutralização demonstraram que as toxinas Shiga, principais marcadores de virulência de cepas de STEC, podem ser divididas em dois grupos antigênicos. O grupo um, Stx1, é neutralizado por anti-soro da citotoxina de *S. dysenteriae* 1, pois são consideradas idênticas (O'BRIEN & LA VECK, 1983) O grupo 2, Stx2, é neutralizável apenas por anti-Stx2 (O'BRIEN & HOLMES, 1987). Os genes estruturais para Stx1 e Stx2 são encontrados em fagos lambda temperados, porém os genes para Stx2 já foram encontrados em cromossomos e apresentam 55 e 57% das seqüências genéticas de suas subunidades A e B idênticas, respectivamente (JACKSON et al., 1987). Stx1 é considerada altamente conservada e suas variantes apresentam poucas diferenças nas suas seqüências genéticas, sem maiores conseqüências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998; DUFFY et al., 2001; THORPE et al., 2002). No entanto, algumas variantes de Stx1 foram descritas: Stx1c e Stx1OX3 encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de humanos e ovinos (KOCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002) e Stx1d, de amostras bovinas (BÜRK et al., 2003). Cinco variantes biológicas de Stx2 foram descritas, as quais diferem umas das outras por sua antigenicidade, toxicidade e seqüência genética (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998; DUFFY et al., 2001; THORPE et al., 2002): Stx2, Stx2c, Stx2d e Stx2f (anteriormente denominada Stx2ev) isoladas de humanos e Stx2e, isolada de suínos.

Stx1 e Stx2 apresentam outras diferenças entre si, como a afinidade pelo receptor em comum, Gb3 e os mecanismos de regulação da expressão: Stx1 possui uma afinidade cerca de 10 vezes maior por Gb3, se comparado a Stx2 (HEAD et al., 1991). No entanto, estudos mais recentes, utilizando métodos automatizados, revelaram uma velocidade de dissociação menor entre Gb3 e Stx2 do que Stx1. Assim, tanto a ligação quanto a dissociação entre o receptor e Stx2 parece ocorrer de forma mais lenta. Estas características podem explicar a maior associação entre Stx2 e danos vasculares, se comparado a Stx1 (NAKAJIMA et al., 2001).

A estrutura A-B da família das toxinas Shiga, holotoxinas de aproximadamente 70kDa, é conservada entre seus membros. A subunidade A, de 32kDa, pode ser clivada proteoliticamente, resultando em dois peptídios: A1 e A2, de 28 e 4kDa, respectivamente, e que permanecem ligados por uma ligação dissulfeto. O peptídio A1 apresenta atividade enzimática (N-glicosidase) enquanto A2 tem a função de ligar a subunidade A ao pentâmero formado por cinco subunidades B idênticas, de 7,7kDa cada. O pentâmero B liga a toxina ao receptor glicolipídico específico, presente na superfície da célula eucariótica, globotriasilceramida (Gb3) para Stx1 e Stx2 e globotetrasilceramida (Gb4) para Stx2e. Após a ligação, a holotoxina sofre endocitose através de depressões da membrana citoplasmática da célula eucariótica revestidas pela proteína clatrina (*coated pits*), formando uma vesícula selada com a holotoxina em seu interior. No citoplasma, esta vesícula pode se fundir com lisossomos, resultando na degradação da toxina. Porém, em células eucarióticas sensíveis a Stx, as vesículas são transportadas até o retículo endoplasmático via complexo de Golgi, alcançando, então, o citosol. Durante este processo, a subunidade A é clivada pela enzima furina, gerando o fragmento cataliticamente ativo, A1 e o fragmento A2, cuja ligação dissulfeto é posteriormente reduzida. O fragmento A1 livre tem atividade RNA N-glicosidase, e interage com a unidade 60S do ribossomo. Ao remover um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA eucariótico, A1 livre impede a ligação do amino-acil-RNA transportador a esta subunidade, inibindo a etapa de alongamento da síntese protéica e causando a morte celular (PATON & PATON, 1998). A toxina Shiga, assim como a toxina colérica, não é capaz de formar poros e alcançar o citosol da célula-alvo.

Habib & Jackson (1993) descreveram os operons de Stxs: uma estrutura em comum, que consiste em uma única unidade transcricional, codificando primeiro a subunidade A, seguida da subunidade B. A tradução da subunidade B ocorre de forma mais intensa do que a subunidade A, devido, aparentemente, à maior afinidade do ribossomo ao seu local de ligação, rbs (ribosome binding site), satisfazendo a relação estequiométrica A1:B5 da holotoxina.

Enterohemolisina (EHEC-Ehly)

Em 1989, Beutin et al., estudando cepas de STEC, observaram que uma cerca de 89% apresentavam um fenótipo hemolítico diferente do padrão já conhecido e associado à alfa-hemolisina de *E. coli* (Hly). As cepas foram denominadas enterohemolíticas e não produziam alfa-hemólise em ágar sangue de carneiro convencional, mas pequenas e turvas zonas hemolíticas após incubação por 18 a 24 horas em ágar sangue com hemácias de carneiro lavadas, suplementado com cloreto de cálcio. Enquanto a alfa-hemolisina é codificada por genes cromossomais, os genes que codificam a enterohemolisina foram descritos em um plasmídio de 60 MDa, pO157, na cepa EDL 933 (SCHIMIDT et al., 1994). Embora a enterohemolisina esteja presente na maioria dos isolados de EHEC/STEC e a enterohemólise sugerida como um marcador para detecção de EHEC (BEUTIN et al., 1996), sua contribuição na patogenicidade de EHEC/STEC ainda não está esclarecida. Sugeriu-se que a lise de eritrócitos pode fornecer ferro e estimular o crescimento de STEC (LAW & KELLY, 1995). O plasmídio pO157 está presente também em cepas do sorotipo O26:H11 e na maioria de STEC isoladas de humanos (BEUTIN et al., 1994; LEVINE et al, 1987), seus genes codificam outros possíveis marcadores de virulência adicionais: uma catalase-peroxidase (KatP) (BRUNDER et al., 1996) e uma serina protease (EspP), capaz de clivar o fator V de coagulação humano e de exacerbar a doença hemorrágica (BRUNDER et al., 1997).

Fatores de adesão

Intimina

Em EHEC, assim como em EPEC, outros fatores de virulência estão localizados cromossomalmente em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E (*attaching and effacing*), caracterizada pela degeneração localizada das microvilosidades epiteliais intestinais e a montagem de estruturas semelhantes a pedestais, constituídas de filamentos de actina, formadas nos locais onde há bactérias aderidas (NATARO & KAPER, 1998). Os genes da região LEE codificam uma adesina não fimbrial de 94 kDa, a intimina (*eae*); um sistema de secreção do tipo III (proteínas Esc e Sep); chaperoninas (proteínas Ces); proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e proteínas efetoras (EspF, EspG e Map), assim como o receptor para intimina (Tir). A função de muitos quadros abertos de leitura (*open reading frames* - ORFs) ainda é desconhecida. (GIRARD et al, 2005). A intimina é fator-chave de colonização para EHEC em ovinos (CORNICK et al., 2002) bovinos recém-nascidos e adultos (DEAN-NYSTROM et al., 1998) e parece ser a única adesina de *E. coli* O157:H7 cujo papel na colonização do epitélio intestinal foi demonstrado em modelos animais (DONNENBERG et al., 1993, McKEE et al., 1995). No entanto, mutantes intimina-negativos ainda são capazes de colonizar certos locais do trato gastrointestinal dos ruminantes, indicando que outros fatores de colonização podem estar presentes (VAN DIEMEN et al., 2005). Em humanos, STEC *eae* positivos estão relacionados a quadros severos de diarreia, principalmente HC, e HUS (KARMALI, 1989; PATON & PATON, 1998). A região 5' do gene *eae* é conservada, enquanto a região 3' é heterogênea. Esta observação tornou possível a confecção de oligonucleotídeos iniciadores universais e alelo-específicos para o ensaio de PCR (*polymerase chain reaction*), permitindo, assim, a diferenciação de 15 variantes de *eae*, que codificam 15 diferentes tipos e subtipos de intimina: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, $\delta/\kappa, \epsilon, \zeta, \eta, \iota, \lambda, \mu, \nu$, e ξ (BLANCO et al., 2004).

Adesinas fimbriais de EHEC

A análise da seqüência genômica de duas cepas protótipos do sorotipo O157:H7 indicou a existência de, no mínimo, 12 regiões que codificam seqüências homólogas a adesinas (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001). Uma dessas regiões contém genes proximalmente relacionados ao *operon lpf* (fimbria longa polar, LP) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (PERNA et al., 2001). A introdução do *operon* EHEC *lpf* em *E. coli* K-12 resultou em um aumento da expressão de fímbrias e da adesão a células em cultivo (TORRES et al., 2002a). A subunidade principal de LP, *lpfA*, foi detectada em cepas de EHEC dos sorogrupos O157 e O145 (SZALO et al., 2002).

Adesinas não-fimbriais de EHEC

Neste grupo estão incluídas as adesinas Efa1 (EHEC *factor for adherece*) (NICHOLLS et al., 2000; STEVENS et al., 2002), Iha (adesina homóloga a IrgA, de *Vibrio cholerae*) (TARR et al., 2000), Cah (homólogo ao antígeno 43 ligante de cálcio) (TORRES et al., 2002b) e OmpA (proteína de membrana externa A) (TORRES & KAPER, 2003). Estas proteínas expressaram suas propriedades de adesão somente em experimentos recombinantes e seu papel na colonização do trato gastrointestinal requer maiores estudos.

Adesinas fimbriais e não-fimbriais de STEC

As cepas de STEC não possuem a região LEE, portanto a ausência de intimina indica que outras adesinas devem estar envolvidas na adesão às células hospedeiras.

A adesina Saa (adesina autoaglutinante de STEC) foi descrita em uma cepa de STEC do sorotipo O113:H21. Saa é uma proteína de membrana externa, associada ao aumento da adesão em células HEp-2 quando expressa como uma proteína recombinante em *E. coli* (PATON et al., 2001). Estudos recentes indicaram que cepas *saa*-positivas são mais freqüentemente encontradas em STEC isolados de bovinos do que de humanos, sugerindo um papel importante desta adesina na colonização intestinal desses animais (JENKINS et al., 2003).

A fímbria LP também foi caracterizada em cepas STEC O113:H21 e o gene *lpfA_{O113}* foi detectado em diversas cepas de *E. coli* isoladas de humanos e animais (OSEK et al., 2003).

Dados epidemiológicos

HUS é considerada uma doença de origem alimentar e foi inicialmente relacionada ao consumo de hambúrgueres, carne moída e laticínios contaminados com STEC (RILEY, 1987). Nos Estados Unidos, a categoria STEC está associada a, aproximadamente, 110.000 casos de doenças e 90 mortes, anualmente (MEAD et al., 1999). No Brasil, de acordo com os registros da AIH/DATASUS/MS, foram notificados 12 casos de HUS no estado de São Paulo no período de 1998/2000, com história anterior de diarreia e possível, porém não confirmado, envolvimento com *E. coli* O157:H7 (Brasil, CVE, 2001). O primeiro relato de isolamento de STEC de um paciente com HUS ocorreu em um hospital da cidade de São Paulo, no ano de 2001 (GUTH, et al., 2002): uma criança, com história de diarreia aguda ocorrida três semanas antes da internação, cujos sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais levaram ao diagnóstico desta síndrome. A cepa isolada pertencia ao sorotipo O26:H11. Vaz et al. (2004), analisando uma coleção de 39 cepas de STEC isoladas de pacientes humanos com diarreia no período de 1976 a 1999, em São Paulo, Brasil, detectou a predominância dos sorogrupos O111 e O26. Os sorotipos encontrados foram: O26:H11, O55:H19, O93:H19, O111:NM, O11:H11, O118:H16 e O157:H7.

Embora o sorotipo O157:H7 esteja ligado à maioria dos surtos associados a STEC descritos mundialmente, estudos recentes indicam que a incidência deste sorotipo vem decaindo substancialmente (CDC, 2004). Em contraste, STEC não-O157 vem sendo isolada com maior frequência à partir de amostras fecais de pacientes com HUS (BANATVALA et al., 2001; JAEGER et al., 2000), entre os quais os sorogrupos O26, O91, O103, O111 e O113 (NATARO & KAPER, 1998; PATON & PATON, 1998) No Brasil, poucas cepas O157:H7 foram isoladas de humanos, no estado de São Paulo. Estes pacientes não apresentavam diarreia sanguinolenta (IRINO et al, 2002).

O primeiro surto de colite hemorrágica ligado a EHEC sorotipo O157:H7 estava relacionado ao consumo de hambúrgueres contaminados, levando à suspeita de um reservatório bovino (RILEY et

al, 1983). Desde então, estudos em diferentes países tem demonstrado que o gado bovino, geralmente saudável, é o principal reservatório de STEC/EHEC: na Argentina, segundo estudos de Sanz et al. (1998), a taxa de isolamento de STEC de bovinos adultos tratados a pasto foi de 22% no campo e, no abatedouro, 44%; enquanto Padola et al. (2004) isolaram STEC e EHEC sorotipo O157:H7 em 63 e 6,8% dos animais de uma fazenda de confinamento, respectivamente. Na Espanha, STEC foi isolada em 37% dos bezerros e em 35% dos bovinos adultos investigados (BLANCO et al., 1997). Nos Estados Unidos, a prevalência de EHEC sorotipo O157:H7 no gado saudável varia de entre 2 a 20% dos animais (MAINIL & DAUBE, 2005). Estes animais podem apresentar um quadro inicial de diarreia quando jovens e, quando se recuperam, tornam-se animais saudáveis, portadores de STEC (VERWEYEN et al, 2000). STEC também foi isolado a partir das fezes de animais domésticos: ovelhas, cabras, cães, gatos e suínos (BEUTIN et al., 1993)

No Brasil, Cerqueira et al. (1999) analisando gado leiteiro e de corte no Estado do Rio de Janeiro, constataram uma alta ocorrência dos genes *stx* nestes animais, detectados por PCR: 82% do gado leiteiro e 53% do gado de corte, sendo 1,5% dos isolados EHEC sorotipo O157:H7. Este foi o primeiro relato de EHEC O157:H7 isolado de gado leiteiro no Brasil Leomil et al. (2003), detectaram, por PCR, a ocorrência dos genes *stx* em 20% dos bezerros diarreicos e em 7,8% dos animais não-diarreicos das fazendas de corte do Estado de São Paulo estudadas. Moreira et al. (2003), analisando fazendas de leite da região de Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul, detectaram STEC em 49% dos animais através do ensaio de citotoxicidade em células Vero. Salvadori et al. (2003) pesquisando bezerros diarreicos da região centro-oeste detectou, por PCR, genes *stx* em 16.1% dos animais. Mais recentemente, Irino et al (2005), isolaram STEC em 25,5% dos animais pesquisados em fazendas de leite no estado de São Paulo. Os genes *stx* foram pesquisados por ensaios de hibridização de DNA em colônias. Dois novos sorotipos de STEC foram encontrados: O79:H14 e O98:H17, enquanto o sorotipo O178:H19, embora anteriormente descrito, fora recentemente detectado somente na Espanha (BLANCO et al., 2004). Os sorotipos O111:NM e O118:H16 descritos nos estudos de Leomil et al. (2003) e Salvadori et al. (2003), além do sorotipo O111:H8 (LEOMIL, et al., 2003) também foram encontrados em pacientes brasileiros com diarreia (GUTH et al., 2002; VAZ et al., 2004).

Elder et al (2000), examinando gado de corte em frigoríficos nos EUA, antes e após o abate, puderam isolar *E. coli* O157:H7 em 28% das fezes, 11 na pele/couro; e , na carcaça, em 43% antes da evisceração, 18% pós-evisceração e 2% após a lavagem da carcaça, pronta para o resfriamento. Cerqueira et al. (1997) encontraram, no Rio de Janeiro uma alta prevalência de STEC em produtos cárneos de origem bovina, cerca de 71%.

Embora alimentos de origem bovina sejam considerados os principais veículos da infecção por STEC/EHEC, outros alimentos sujeitos à contaminação por fezes bovinas no cultivo e/ou produção também são potencialmente perigosos, como frutas e vegetais crus, maionese, suco de maçã e salame (PATON & PATON, 1998). O maior surto de EHEC, relatado até 1997, ocorreu na cidade de Sakai, Japão, devido ao consumo de brotos de rabanete crus contaminados e resultou em mais de 6000 casos de HC e mais de 100 casos de HUS (SWINBANKS, D 1996).

Conclusão

Embora as graves doenças humanas associadas a STEC têm sido pouco descritas no Brasil, podemos observar uma significativa ocorrência destas cepas nos rebanhos bovinos, bem como a correlação entre sorotipos encontrados nestes animais e em pacientes humanos. Temos, ainda, a proximidade de nosso Estado com a Argentina, país onde HUS é endêmica. A adoção de medidas de prevenção da contaminação por STEC dos produtos destinados ao consumo humano é, portanto necessária.

Referências

- BANATVALA, N., GRIFFIN, P. M., BARRETT, T. J., GREENE, K. D., BIBB, W. F., GREEN, WELLS, J. G. E COLABORADORES DE H.U.S.S. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. *Journal of Infectious Diseases*, v. 183, n. 7, p.1063-1070, Mar 2001.
- BEUTIN, L., MONTENEGRO, M. A., ORSKOV, I., ORSKOV, F., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. n.27, v., p.2559-2564. 1989.
- BEUTIN, L., GEIER, D., STEINHUCK, H., ZIMMERMANN, S., SCHEUTZ, F., Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.9, p.2480-2488. Sept. 1993.
- BEUTIN, L., ALEKSIC, S., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. Virulence factors and phenotype traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans patients in Germany. *Medical Microbiology and Immunology*, v.183, n.1, p.13-21, Feb. 1994.
- BEUTIN, L., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.11, p.2812-2814, Nov. 1996.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., BLANCO, J., MORA, A., PRADO, C., ALONSO, M. P., MOURIÑO, M., MADRID, C., BALSALOBRE, C., JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxi-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology*, v.54, n.3-4, p.309-319, Mar 1997.
- 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 Shiga-toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain: Identification of a new intimin variant gene (*eae- ε*). *Journal of Clinical Microbiolog*, v. 42, n.2, p.645-651, Feb.2004.

Brasil, Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP. Manual das doenças transmitidas por alimentos. 2001. Disponível em <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ecolinet.htm>.. >Acessado em 20/10/2006.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. Coli neapolitanum* from summer diarrhea of infants. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v.57, p. 239-247, 1945.

BRUNDER, W., SCHMIDT, H., KARCH, H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, v.142, n. 11, p.3305-3315, Nov. 1996.

BRUNDER, W., SCHMIDT, H., KARCH, H. Esp P, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular Microbiology*, v.24, n.4, p.767-778, May 1997.

BÜRK, C., DIETRICH, R., AÇAR, G., MORAVEK, M., BÜLTE, M., MÄRTLBAUER, E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.5, p.2106-2112, May 2003.

CALDERWOOD, S. B., ACHESON, D. W. K., KEUSCH, G. T., BARRETT, T. J., GRIFFIN, P. M., STOCKBINE, N. A., SWAMINATHAN, B., KAPER, J. B., LEVINE, M. M., KAPLAN, B. S., KARCH, H., O'BRIEN, A. D., OBRIG, T. G., TAKEDA, Y., TARR, P. I., WACHSMUTH, I. K. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* v.62, p.118-119, Mar. 1996.

CAMPOS, L. C., FRANZOLIN, M R., TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. *Memórias do. Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.6, p.545-552, Oct 2004.

Center for Diseases Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-selected sites. United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.53, n.16, p.338-343, Nov 2004.

- CERQUEIRA, A. M. F., GUTH, B. E. C., JOAQUIM, R. M., ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 70, n.1-2, p.111-121, Oct. 1999.
- CORNICK, N. A., BOOHER, S. L., MOON, H. W. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infection and Immunity*, v.70, n.5, p.2704-2707, May 2002.
- DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., MOON, H. W., O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infection and Immunity*, v.66, n.9, p.4560-4563, Sep 1998.
- DONNENBERG., M. S., TZIPORI, S., MCKEE, M. L., O'BRIEN, D. O., ALROY, J., KAPER., J. B. The role of *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *Journal of Clinical Investigation*, v. 92, n.3, p.1418-1424, Sep 1993.
- DUFFY, G., GARVEY, P., MCDOWELL, D. A. Nomenclature of verocytotoxins. In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Ed Duffy, G., Garvey, P., McDowell, D. A. p: 447-452. Trumbull, Ct: Food and Nutrition Press, Inc., 2001.
- ELDER, R. O., KEEN, J. E., SIRAGUSE, 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, Mar 2000.
- GILES, C., SANGSTER, G. An outbreak of infantile gastro-enteritis in Aberdeen., *Journal of Hygiene*, v.46,n.1, p.1-9, 1948.
- GIRARD, F., BATHISSON, I., FRANKEL, G. M., HAREL, J., FAIRBROTHER, J. M. Interaction of enteropathogenic and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and tir in adherence. *Infection and Immunity*, v.73, n.9, p. 6005-6016, Sep. 2005.
- GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, v. 13, n.1, p. 60-98, Jan 1991.

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

HABIB, N. F., JACKSON, M. P. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga-toxin genes. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 3, p. 597-603, Jan. 1993.

HAYASHI, T., MAKINO, K., OHNISHI, M., KUROKAWA, K., ISHII, K., YOKOYAMA, K., HAN, C., OHTSUBO, E., NAKAYAMA, K., MURATA, T., TANAKA, M., TOBE, T., IIDA, T., TAKAMI, H., HONDA, T., SASAKAWA, C., OGASAWARA, N., YASUNAGA, T., KUHARA, S., SHIBA, T., HATTORI, M., SHINAGAWA, H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research*, v.8, n.1, p. 11–22, 2001.

HEAD, S. C., KARMALI, M., A., LINGWOOD., C. A. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n.6, p. 3617-3621, Feb. 1991.

IRINO, K., VAZ, T. M. I., KATO, M. A. M. F., NAVES, Z. V. F., LARA, R. R., MARCO, M. E. C., ROCHA, M. M. M., TÂNIA P. 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, n.4., p. 446-447, Apr 2002.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. *CAB International*, p 666, 1994.

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, n.1, p.29-36, Jan 2005.

JACKSON, M. P., NEILL, R. J., O'BRIEN, A. D., HOLMES, R. K., NEWLAND, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters*, v.44, n.1, p.109-114, Sep.1987.

JAEGER, J. L., ACHESON, D. W. Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Current Infectious Diseases Reports*, v.2, n., p.61-67, 2000.

JENKINS, C., NEIL T., PERRY, N. P., CHEASTY, T., SHAW, J. D. J., FRANKEL, G., DOUGAN, G., GUNN, G. J., SMITH, H. R., PATON, A. W., PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.4, p.1775-1778, Apr 2003.

KARMALI, M.A., STEELE, B.T., PETRIC, M., LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, v.19, n.1, p.619-20, Mar. 1983.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.2, n.1, p.15-38, Jan 1989.

KAUFFMANN, F. The serology of the *coli* group. *Journal of Immunology*, v.57, p. 71-100. 1947.

KOCH, C., HERTWIG, S., LURZ, R., APPEL, B., BEUTIN, L. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx1_{OX3}* gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheeps and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n.11, p.3992-3998, Nov. 2001.

KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J. L., STARVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 18, n.3, p.775-779, Dec 1977.

LAW, D., KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infection and Immunity*, v. 63, n.2, p.700-702, Feb. 1995.

LEOMIL, L., AIDAR-UGRINOVICH, L., GUTH, E. E. C., IRINO, K., VETTORATO, M. P., ONUMA, D. L., CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.97, n.1-2, p.103-109, Dec 2003.

LEVINE, M. M., XU, J., KAPER, J. B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WASCHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 156:175-182. 1987.

LEVINE, M. M., XU, J., KAPER, J. B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WASCHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, v. 156, n.1, p.175-182, Jul. 1987.

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, May 2005.

MAINIL, J. G., DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animal, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n.6, p.1332-1344, Dec. 2005.

McKEE, M. L., MELTON-CELSA, A. R., MOXLEY, R. A., FRANCIS, D. H., O'BRIEN, A. D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, v.63, n.9. p. 3739–3744, Sep 1995.

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, n.5, p. 607-625, Sep-Oct 1999.

MELTON-CELSEA, A. R., O'BRIEN, A. D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin producing *E. coli* strains. Ed Kaper, J. B. & O'Brien, A. D. pp121-128. Washington, DC: ASM Press. 1998.

- McKEE, M. L., MELTON-CELSEA, A. R., MOXLEY, R. A., FRANCIS, D. H., O'BRIEN, A. D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, v.63,n.9, p.3739-3744, Sep 1995.
- MOREIRA, C. N., PEREIRA, M. A., BROD, C. S., RODRIGUES, D. P., CARVALHAL, J. B., ALEIXO, J. A. G. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 93, n.3, p.179-183, May 2003.
- NAKAJIMA, H., KIYOKAWA, N., KATAGIRI, Y. U., TAGUCHI, T., SUZUKI, T., SEKINO, T., MIMORI, K., EBATA, T., SAITO, M., NAKAO, H., TAKEDA, T., FUJIMOTO, J. Kinetic Analysis of Binding between Shiga Toxin and Receptor Glycolipid Gb3Cer by Surface Plasmon Resonance. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.46, p. 42915-42922, Nov. 2001.
- NATARO, J. P., KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* v.11, n.1, p.142-201, Jan 1998.
- National Institute of Health and Infectious Diseases. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June, 1997. *Infectious Agents Surveillance Report*, v.18, p.153-154, 1997.
- 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 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Molecular Microbiology*, v.35, n.2, p.275-288, Jan 2000.
- O'BRIEN, A. D., LA VECK, G. D., THOMPSON, M. R., FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* v.146, n.6, p.763-769. 1982.
- 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. 1, p.675-683, May 1983.
- O'BRIEN, A. D., LIVELY, T. A., CHEN, M. E., ROTHMAN, S. W., FORMAL, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *The Lancet*, v.26, n.1, p.702, Mar.1983.

- O'BRIEN, A. D., HOLMES, R. K. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press. Washington, DC. p.2788-2802. 1986.
- OSEK J., WEINER, M., HARTLAND, E.L. Prevalence of the lpfO113 gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. *Veterinary Microbiology*, v.96, n.3, p.259-266, Oct 2003.
- 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, n.1, p.3-9, May 2004.
- 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, Jul. 1998.
- PATON, A. W., SRIMANOTE, P., WOODROW, M. C., PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity*, v.69, n.11, p.6999-7009, Nov 2001.
- PERNA, N. T., PLUNKETT, G., BURLAND, V., MAU, B., GLASNER, J. D., ROSE, D. J., MAYHEW, G., F.,EVANS, P. S., GREGOR, J., KIRKPATRICK. H. A., PÓSFAL, G., HACKETT, J., KLINK, S., BOUTIN, A., SHAO, Y., MILLER, L., GROTBECK, E. J., DAVIS, W.,LIMK, A., DIMALANTAK, E. T., POTAMOUSIS, K. D., APODACA, J., ANANTHARAMAN, T. S., LIN, J.,YEN, G., SCHWARTZ, D. C., WELCHI, R. A., BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, v. 409, p. 529-533, Jan 2001.
- RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B., WELLS, J. G., DAVIS, B. R., HEBERT., R. J., OLCOTT, E. S., JOHNSON, L. M., HARGRETT, N. T., BLAKE. P. A., COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, v.308, n.12, p.681-685. Mar. 1983.

- RILEY, L. W. The epidemiological, clinical and microbiologic features of haemorrhagic colitis. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p.383-407, Oct 1987.
- ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Reviews of Infectious Diseases*. v.9, n.1, p. 28-53, 1987.
- 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, n.3, p.230-235, Sep 2003.
- SANZ, M. E., VIÑAS, M. R., PARMA, A. E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*, v.14, n.4, p.399-403, Jun 1998.
- SCHMIDT, H., KARCH, H., BEUTIN, L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. *FEMS Microbiology Letters*, v.117, n.2. p.189-196, Apr.1994.
- SMITH, A.G., HILLIER, J., MUDD, S. Internal structure and nuclei in cells of *Escherichia coli* as shown by improved electron microscopic techniques. *Journal of Bacteriology*, v.57, n.3., Mar 1949.
- STEVENS, M.P., VAN DIEMEN, P.M., FRANKEL, G., PHILLIPS, A.D., WALLIS, T.S.. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infection and Immunity*, v.70, n.9, p.5158-5166, Sep 2002 .
- SWINBANKS, D. Japan shuns radishes after 'possible link' to *E. coli*. *Nature*, v.382, p.567, Aug 1996.
- SZALO, I. M., GOFFAUX, F., PIRSON, V., PIÈRARD, D., BALL, H., MAINIL, J. Presence of bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Research in Microbiology*, v.153, n. 10, p.653-658, Dec 2002.
- TARR, P. I., BILGE, S. S., VARY, JR., J. C., JELACIC, S., HABEEB, R. L., WARD, T. R., BAYLOR, M. R., BESSER, T. E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring

molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity*, v. 68, n.3, p.1400-1407, Mar 2000.

THORPE, C. M., RITCHIE, J. M., ACHESON, D. W. K. Enterohemorrhagic and other Shiga toxin producing *Escherichia coli*. In *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. ed. Donnenberg, M. S. p.119-154. San Diego, CA, USA: Academic Press. 2002.

TORRES, A. G., GIRON, J. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., BLATTNER, F. R., AVELINO-FLORES, F., KAPER, J. B. Identification and Characterization of *lpfABCC'DE*, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, v.70, n.10, p. 5416-5427, Oct 2002a.

TORRES, A. G., PERNA, N. T., BURLAND, V., RUKNUDIN, A., BLATTNER, F. R., KAPER, J. B. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, v.45, n.4, p. 951, Aug 2002b.

TORRES, A. G., KAPER, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa Cells. *Infection and Immunity*, v.71, n.9, p.4985-4995, Sep 2003.

VAN DIEMEN, P. M., DZIVA, F., STEVENS, M. P., WALLIS, T. S. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H genes required for intestinal colonization in calves. *Infection and Immunity*, v. 73, n.3, p.1735-1743, Mar 2005.

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

VERWEYEN, H. M., KARCH, H., BRANDIS, M., ZIMMERHACKL, L. B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatric Nephrology*, v.14, n., p.73-83, Oct 2000.

ZHANG, W., BIELASZEWSKA, M., KUCZIUS, P., KARCH, H. Identification, characterization and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans.

Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n.4, p.1441-1446, Apr. 2002.