

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO HISTOLÓGICO DE INTESTINO DELGADO DE
CAMUNDONGOS COLONIZADOS POR CEPAS DE
Escherichia coli ENTEROPATOGENICAS DE ORIGEM
BOVINA**

Simone Barone Salgado Marques

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP , Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Simone Barone Salgado Marques, nascida em 12 de junho de 1969, no Rio de Janeiro, filha de Hilário Vaamonde Salgado e Solange Barone Salgado. Mestre em Microbiologia. Graduada em Farmácia-Bioquímica pela Fundação Educacional de Barretos em dezembro de 2006; em Odontologia pela Fundação Educacional de Barretos em dezembro de 1990, com especialidade em endodontia. Atualmente professora das disciplinas de Histologia e Embriologia e Microbiologia da UNIFEB.

Ofereço

Aos meus filhos Victor, Vinicius e Guilherme e ao meu marido Jorge Henrique pela confiança e total apoio durante a realização deste trabalho.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Moacir Marin**, pelo exemplo de profissionalismo, seriedade, e pela orientação que sem limites permitiram a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Sou particularmente agradecida ao Professor Doutor Sebastião Hetem por todo o seu carinho, dedicação e facilidades concedidas ao longo deste trabalho.

À minha grande amiga Professora Doutora Renata Camacho Miziara por toda a sua paciência, amizade e total disponibilidade a mim oferecida.

À Deus, por tornar possível mais uma etapa da minha vida.

À Faculdade de Odontologia de Barretos, por proporcionar a realização deste trabalho.

À Técnica do laboratório de Histologia da Fundação Educacional de Barretos Terezinha, pela sua ajuda e disponibilidade na confecção do material histológico.

A todos os colegas que conviveram e participaram, diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. <i>Escherichia coli</i>.....	5
2.1.1. Taxonomia.....	5
2.1.2. Síndromes gastroentéricas por <i>Escherichia coli</i>	7
2.1.3. Riscos de infecção por <i>Escherichia coli</i>	10
2.1.4. Mecanismos de patogenicidade por cepas de <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.5. Epidemiologia.....	16
2.2. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica.....	16
2.3. Modelo de infecção por <i>Escherichia coli</i> em camundongo.....	19
3. OBJETIVO.....	22
4. MATERIAIS MÉTODOS.....	23
4.1. Linhagens de EPEC.....	23
4.2. Animal e infecção.....	23
4.3. Exame histológico.....	24
4.4. Etapas de preparação de lâminas histológicas.....	25
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

9-ABSTRACT..... 58

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: A figura mostra o principal mecanismo de patogenicidade da EPEC, que é uma lesão provocada pela sua aderência ao epitélio através do "attaching and effacing" (A/E).....	3
Tabela 1: Sumário das cepas de <i>Escherichia coli</i> diarreioogênicas.....	15
Figura 2: Animal controle. Corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo "Mus musculus" com 20 dias, sem a presença de alterações histológicas e patológicas. Seta grossa: célula caliciforme, seta fina enterócitos.....	28
Figura 3: Animal controle. Corte transversal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo "Mus musculus" com 20 dias, sem a presença de alterações histológicas e patológicas.....	29
Figura 4: Linhagem1: EPEC padrão, corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo "Mus musculus" com 20 dias, Apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta grossa: célula caliciforme, seta fina enterócitos.....	30
Figura 5: Linhagem 2 patogênica: 537-1 corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo "Mus musculus" com 20 dias, Apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta: lâmina própria.....	31
Figura 6: Linhagem 4: patogênica 304-3 corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo "Mus musculus" com 20 dias, epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta: artefato de técnica.....	32
Figura 7: Linhagens 1: EPEC padrão CDC 3111-90 corte transversal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE	

- (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias, apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta: artefato de técnica..... **33**
- Figura 8:** Linhagem 2 patogênica: 537-1 corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias, apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Chave: identifica um vilão; setas: linfócitos..... **34**
- Figura 9:** Linhagem 4 patogênica: 304-3 corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias, epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório..... **35**
- Figura 10:** Linhagem 3 patogênica: 263 corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias. A camada superficial está rompida em vários locais e apresenta contorno irregular com presença de infiltrado inflamatório. Seta: rompimento da superfície do epitélio. **36**
- Figura 11:** Linhagem 5 patogênica: 988-2 corte longitudinal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias, apresentou rompimento e contorno irregular das células epiteliais das vilosidades intestinais, chegando a atingir a lâmina própria, a qual apresentou infiltrado inflamatório. Setas finas, rompimento do epitélio; seta grossa rompimento do epitélio com invasão da lâmina própria..... **37**
- Figura 12:** Linhagem 5 patogênica: 988-2 corte transversal. Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias, o epitélio apresentou lesões, observado por pequenos conjuntos de células em degeneração, separados por expansões intervenientes de epitélio de mucosa normal. Setas finas, rompimento do

epitélio; seta grossa rompimento do epitélio com invasão da lâmina própria.

Seta : linfócito, cabeça de seta: rompimento do epitélio..... **38**

**ESTUDO HISTOLÓGICO DE INTESTINO DELGADO DE CAMUNDONGOS
COLONIZADOS POR CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENICAS DE
ORIGEM BOVINA**

RESUMO - A aderência de bactérias patogênicas a receptores na superfície de células epiteliais tem sido reconhecida como um importante evento inicial da colonização bacteriana. O principal mecanismo de patogenicidade da EPEC é uma lesão provocada pela sua aderência ao epitélio através do "attaching and effacing" (A/E), que é caracterizado pela íntima adesão da bactéria à célula do hospedeiro, esta adesão às microvilosidades do enterócito ocorre devido a formação de estruturas semelhantes a pedestais. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de infecção com a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) em camundongo do tipo *mus musculus*. A estes animais foram administrados um inoculo de 10^8 CFU de linhagens EPEC, sendo que a linhagem 3111-90 foi proveniente de cepas que podem causar diarreia infantil e as linhagens 537-1, 263, 304-3 e 988-2 foram provenientes de leite mastítico bovino. As linhagens foram introduzidas em camundongos com vinte dias de vida por via intraperitoneal, e estes foram eutanasiados cinco horas após a inoculação. Como resultado através de cortes histológicos seriados, verificou-se que algumas das linhagens inoculadas levaram ao aparecimento de lesões suaves na mucosa intestinal, com a quebra da camada celular superficial da mucosa, aparecimento de células epiteliais com contornos irregulares e infiltração de células inflamatórias.

Palavras-chave: EPEC, lesões histopatológicas, modelo em camundongo.

1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, que é juntamente com o *Staphylococcus aureus* a mais comum e uma das mais antigas bactérias parasitas do Homem, sendo o seu habitat natural o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente.

Possuem fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia. Muitas produzem exotoxinas. A estirpe de *E.coli* que existe normalmente nos intestinos de um determinado indivíduo é bem conhecida e controlada pelo seu sistema imunitário, e raramente causa problemas, exceto quando há debilidade do indivíduo. A maioria das doenças é devida a *E.coli* vindas de indivíduos diferentes e portanto de estirpe diferente, não reconhecida pelos linfócitos. As intoxicações alimentares em particular são quase sempre devidas a bactérias de estirpes radicalmente diferentes.

O termo *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi criado para designar *E.coli* de sorotipos que mostraram ser patogênicos para a espécie humana com o potencial particular de causar infecção entérica ao invés de infecção extra-intestinal. Desde que esta definição original de EPEC foi feita, foi demonstrado que a *E. coli* pode causar doença intestinal através de diversos mecanismos diferentes. O termo EPEC veio para designar linhagens que causam doença intestinal, não produzem enterotoxinas atualmente designadas como lábeis ao calor ou estáveis ao calor e que não são enteroinvasivas. Os mecanismos pelos quais as EPEC podem causar doença não são bem definidos. É possível que o grupo atualmente designado como EPEC inclua linhagens que atuem através de diferentes mecanismos patogênicos.

EPEC foi inicialmente implicada em doenças infecciosas humanas no início de 1940 como um resultado de análises de epidemias de gastroenterite infantil aguda. As linhagens de EPEC infectam populações humanas através do mundo e permanecem como uma das causas primárias de diarreia infantil em países em desenvolvimento. No Brasil, por exemplo, linhagens de EPEC são isoladas de 30% ou mais de crianças de baixo status sócio econômico com diarreia.

Historicamente, as linhagens de EPEC têm sido identificadas pelo sorotipo, a combinação distinta de antígenos, O (somático) e H (flagelar), os quais tem sido associados epidemiologicamente, à diarreia infantil. Em 1987, a Organização Mundial de Saúde reconheceu como sorotipos de EPEC um grupo de 12 sorogrupos O diferentes. Nos últimos 15 anos, entretanto, as ferramentas para identificar EPEC, têm sido refinadas com base na patogênese de EPEC e nos genes de virulência específica que têm sido descritos.

A aderência de bactérias patogênicas a receptores na superfície de células epiteliais tem sido reconhecida como um importante evento inicial da colonização bacteriana.

O principal mecanismo de patogenicidade da EPEC é uma lesão provocada pela sua aderência ao epitélio através do "attaching and effacing" (A/E), que é caracterizado pela íntima adesão da bactéria à célula do hospedeiro, esta adesão às microvilosidades do enterócito ocorre devido a formação de estruturas semelhantes a pedestais (fig. 1). Os determinantes genéticos para a produção de lesões A/E estão localizados na membrana apical do enterócito (LEE), onde as EPEC secretam uma proteína de membrana de 94-KDa denominada intimina, a qual é responsável pela íntima adesão da bactéria à membrana do enterócito. A intimina é codificada pelo gene *eae*, o qual se localiza numa ilha de patogenicidade .

A *E. coli* enteropatogênica encontrou um mecanismo diferente de aderir em célula hospedeira, ou seja, ela produz e injeta seu próprio receptor (Tir) na célula hospedeira para que ocorra a adesão, as proteínas que participam deste processo se denominam com prefixo Esp de Enteropathogenic secreted proteins.

Principal mecanismo de patogenicidade da EPEC

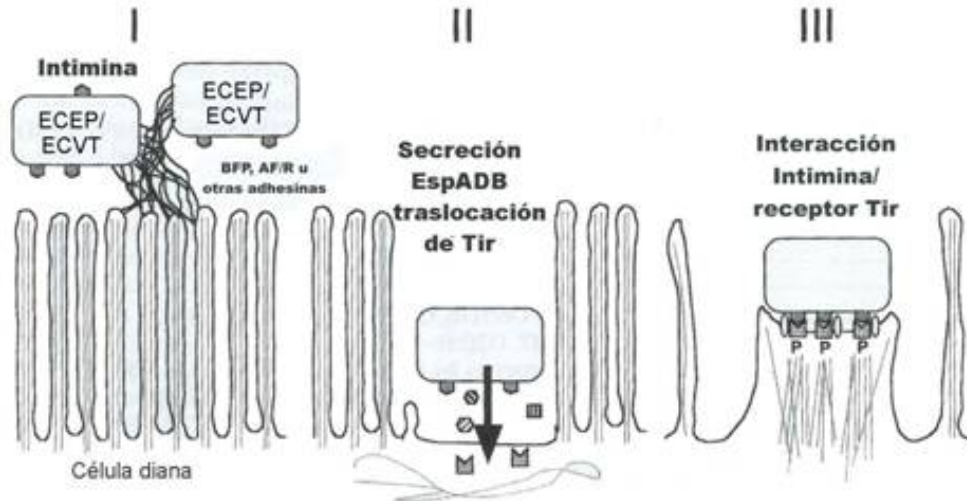


Figura 1: A figura mostra o principal mecanismo de patogenicidade da EPEC, que é uma lesão provocada pela sua aderência ao epitélio através do "attaching and effacing" (A/E), que é caracterizado pela íntima adesão da bactéria à célula do hospedeiro: I) através do pili; II) a bactéria então injeta o seu próprio receptor chamado de Tir; III) esta adesão às microvilosidades do enterócito ocorre devido a adesão Tir + Intimina (expressa na superfície da bactéria) formando estruturas semelhantes a pedestais

As linhagens que apresentam este tipo de lesão foram reagrupadas com o nome *E. coli* "attaching/effacing" (AEEC), foram identificadas cinco variantes do gene *eae* classificadas em α , β , γ , δ e ϵ . A maioria das linhagens EPEC apresenta uma aderência padrão, chamada de aderência localizada. Este fenômeno está associado com a presença do fator de aderência plasmidial (EAF). O plasmídeo EAF não é essencial para a formação de lesões A/E, embora sua presença aumente a eficiência do processo.

A mastite é um problema muito importante em fazendas de leite, e a mastite provocada por *E. coli* em especial é uma das principais doenças que acomete estes

rebanhos. Baseado em estudos epidemiológicos, foi levantada a hipótese que as vacas são infectadas com *E. coli* provenientes de seu meio ambiente (fezes e palha).

Embora a EPEC seja uma causa freqüente de doença no ser humano, tem sido difícil de estabelecer uma metodologia para infecções experimentais em animais utilizando estes microrganismos. Os melhores resultados foram obtidos fornecendo aos camundongos drogas anti-bacterianas antes da realização do experimento, a fim suprimir sua microbiota intestinal endógena. Entretanto este tratamento elimina o equilíbrio competitivo entre a microbiota endógena e as bactérias patogênicas.

O camundongo como modelo de infecção é um animal muito utilizado para este tipo de estudo, devido as fêmeas apresentarem um período gestacional rápido, cerca de dezenove dias, ao seu baixo custo, são modelos mais fáceis para se avaliarem os resultados e além de tudo são mais confiáveis em relação à reprodutibilidade dos resultados de pesquisas com *E. coli*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Taxonomia

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Fontes de carbono como acetato e glicose são usados para crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. A glicose é fermentada a ácidos: láctico, acético e fórmico, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. Acetoína ou acetil metil carbinol não são formados. Conseqüentemente, *E. coli* produz β -galactosidase e indol mas não forma sulfeto de hidrogênio ou hidrolisa a uréia (BRENNER, 1984; ORSKOV, 1984; ACHA & SZYFRES, 2001).

A *E. coli* é a espécie comensal predominante na microbiota anaeróbica facultativa do trato intestinal dos humanos e dos animais de sangue quente (DRASAR & HILL, 1974) A habilidade para distinguir cepas de *E. coli* sorologicamente é importante em esclarecer as pesquisas, mostrando que certos tipos de *E. coli* causam diarreia de verão ou diarreia infantil. A sorologia é baseada em diferentes antígenos encontrados em estrutura da superfície bacteriana. Os três antígenos fundamentais são O,K,H (ORSKOV & ORSKOV, 1984; MENG *et al.*, 2001). Os antígenos somáticos "O" termoestáveis, relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares "H" termolábeis, relacionados com proteínas dos flagelos, e antígenos capsulares "K" termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares. Foram

descritos, até o momento, 173 antígenos O, 56 H e 100 K diferentes (FRANCO & LANDGRAF, 1996; ACHA & SZYFRES, 2001; MENG *et al.*, 2001).

As cepas de *E. coli* que produzem gastroenterites em crianças, adultos e animais são denominadas enteropatogênicas, podendo-se distinguir categorias: enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) (LEVINE, 1987; JAY, 1994; HITCHINS *et al.*, 1995; TRABULSI *et al.*, 1996; VARNAM & EVANS, 1996; BUCHANAN & DOYLE, 1997; SILVA *et al.*, 1997; HARRIGAN, 1998; MENG *et al.*, 2001), facultativamente enteropatogênica (FEEC) (JAY, 1994; FRANCO & LANDGRAF, 1996), enteroagregativa (EA_ggEC) (HITCHINS *et al.*, 1995; TRABULSI *et al.*, 1996; FRANCO & LANDGRAF, 1996; VARNAM & EVANS, 1996; BUCHANAN & DOYLE, 1997; HARRIGAN, 1998; MENG *et al.*, 2001), difusivamente aderente (DAEC) (TRABULSI *et al.*, 1996; BUCHANAN & DOYLE, 1997; HARRIGAN, 1998; MENG *et al.*, 2001), uropatogênica (UPEC), neo natal meningite (NMEC) (ADAM & MOSS, 1997) com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia.

Os primeiros estudos sobre diarreia relacionada com *E. coli* foram os realizados por ocasião de uma epidemia que ocorreu em uma creche aos meados da década de 1940 que produziu um índice de mortalidade da ordem de 50%. Em meados da década de 1950, comprovaram-se que alguns isolamentos produziam respostas na prova de alça intestinal de coelho parecidas com as que produzia o *Vibrio cholerae*. Estes achados conduziram os estudos de *E. coli* como possível agente etiológico de enfermidades semelhantes à cólera na Índia. As primeiras referências de cepas produtoras de enterotoxinas em animais jovens com diarreia apareceram em 1967, e em 1970 descobriu-se que as cepas virulentas produziam enterotoxinas (SACK, 1975).

As cepas de *E. coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como microrganismo indicador, a presença de *E. coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como microrganismo potencialmente patogênico

transmitido por alimentos, as reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novo significado, em especial quando as condições do meio em que se encontra permitem sua multiplicação.

2.1.2 Síndromes gastrointestinais por *Escherichia coli*

Anterior à década de 70, os informes sobre gastroenterites de origem alimentar relacionadas com *E. coli* eram esporádicos, entretanto, o surto que ocorreu nos Estados Unidos, atribuído ao queijo importado, foi o centro de atenção sobre este microrganismo como patógeno transmitido por alimentos. O fato coincidiu com o interesse dos médicos microbiologistas pela *E. coli* como causa de diarreia em crianças, levando a idealizar métodos "in vitro" específicos e seguros, e métodos de bioensaio para avaliar os componentes tóxicos e a uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência deste microrganismo (JAY, 1994).

As diferentes classes de *E. coli* apresentam características e síndromes específicas reconhecidas internacionalmente ao longo do tempo. As cepas de EPEC são agentes causais da diarreia infantil (lactentes) e recém nascidos (ROBINS-BROWNE, 1987; PADHYE & DOYLE, 1992; HITCHINS *et al.*, 1995; MENG *et al.*, 2001), entretanto, muitos adultos são considerados portadores não apresentando sintomas da doença, levando a crer que a imunidade adquirida ocorra com o passar do tempo (PADHYE & DOYLE, 1992; MENG *et al.*, 2001).

Cepas de *E. coli* consideradas EPEC pertencem a um número restrito de sorotipos. Os sorogrupos 026, 055, 086, 011, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128ab, 0142, 0158 incluem sorotipos de EPEC. A diarreia por elas provocada é, clinicamente, mais grave do que aquelas provocadas por outros patógenos, sendo geralmente, acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, com duração de seis horas a três dias (média de 24 horas), cuja incubação varia entre 17 e 72 horas (média de 36 horas) (SENERWA *et al.*, 1989; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As cepas de *E. coli* produtoras de enterotoxinas são conhecidas como ETEC e um número limitado de sorotipos de *E. coli* está associado com regularidade aos casos de diarreia. A síndrome se caracteriza por diarreia aquosa, é acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas. A forma mais severa assemelha-se à cólera: fezes aquosas (água de arroz) que levam à desidratação. O período de incubação varia de oito a 44 horas (média de 26 horas) com alta dose de infecção (10^6 a 10^8 células). Em indivíduos desnutridos, a gastroenterite pode durar várias semanas, levando a um quadro de desidratação grave, e nos casos de diarreia dos viajantes, esta pode ser leve e auto-limitante (PADHYE & DOYLE, 1992; SHUTERLAND *et al.*, 1995; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As cepas de EIEC são capazes de penetrar em células epiteliais do cólon e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*. A maioria delas apresenta características bioquímicas peculiares que a torna diferente das demais cepas de *E. coli*, tornando-a semelhante à *Shigella*, como a incapacidade de descarboxilar a lisina, a não fermentação ou fermentação tardia da lactose e ausência de flagelos. Os limitados sorogrupos conhecidos são 021, 028ac, 029, 0112c, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164, 0167, 0173. A gastroenterite é bastante semelhante àquela determinada por *Shigella*, com desintéria, cólicas abdominais, febre e mal estar geral com eliminação de sangue e muco nas fezes. O período de incubação varia entre oito e 24 horas (média de 11 horas). Estudos realizados com voluntários adultos indicam que a dose infectante é alta (10^6 a 10^8 células) (PADHYE & DOYLE, 1992; SHUTERLAND *et al.*, 1995; FRANCO & LANDGRAF, 1996; VARNAM & EVANS, 1996; MENG *et al.*, 2001) enquanto que para a *Shigella* é de 10^3 , provavelmente devido à baixa resistência ao ácido gástrico e pela diferença da membrana protéica externa (SMALL & FALKOW, 1988).

O grupo de *E. coli*, denominado EHEC designado para alocar as cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O157:H7, incriminado como agente etiológico da colite hemorrágica, sendo proposta, atualmente, a inclusão do sorotipo O26:H11. Tais cepas têm algumas propriedades que as diferenciam das demais *E. coli*, pois não são capazes de fermentar o sorbitol, são β -glucuronidase negativos e têm dificuldades de

se multiplicar ou mesmo não se multiplicar nas temperaturas normalmente empregadas para pesquisa de *E. coli* em alimentos (44,5°C/45,5°C) (SZABO *et al.*, 1986; HITCHINS *et al.*, 1992; WILLSHAW *et al.*, 1993; BOURGEOIS *et al.*, 1994; FRANCO & LANDGRAF, 1996). A colite hemorrágica é caracterizada, clinicamente, por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta, diferindo das manifestações clínicas causadas por outros agentes invasores, pela grande quantidade de sangue nas fezes e ausência de febre.

A enterocolite pode evoluir gravemente para síndrome urêmica hemolítica com destruição de eritrócitos e falha aguda dos rins, necessitando de diálise, transplante dos rins e podendo ser fatal (RYAN *et al.*, 1986; ANON, 1987; RILEY, 1987; KARMALY, 1989; MENG *et al.*, 1994; WEAGANT *et al.*, 1995; FRANCO & LANDGRAF, 1996; ACHA & SZYFRES, 2001; MENG *et al.*, 2001). Ainda não se sabe ao certo a dose infectante necessária para provocar os sintomas a partir da ingestão de alimentos contaminados, porém de acordo com dados obtidos de surtos esta parece ser baixa, entre 10 a 10000 células por grama ou mililitro de produto consumido (LIOR, 1994). Para BUCHANAN & EDELSON (1996) a dose infectiva é de 2 a 2000 células com base nos surtos, nos quais se mostraram acentuadamente ácido tolerante. A cepa denominada *E. coli* facultativamente enteropatogênica (FEEC), aparentemente associada a surtos esporádicos de diarreia, segundo JAY (1994); FRANCO & LANDGRAF (1996), tal relação, no entanto, não foi ainda provada. Com referência às cepas enteroagregativas (EAggEC), são relatadas como sendo pertencentes a uma linhagem recentemente descrita, com poucos dados disponíveis ao seu respeito. A patogenicidade parece estar relacionada com a adesão à mucosa intestinal, sendo que o modelo de adesão é diferente daquele apresentado por EHEC, EPEC ou EIEC; ocorrendo principalmente no cólon, não sendo observada no íleo ou no duodeno, e é manose resistente. A adesão é mediada por fímbrias que são na verdade, conjunto de microfibrilas associadas em feixes, chamadas BFP "BUNDLE FORMING PILUS", que são diferentes das outras fímbrias de adesão. Alguns relatos indicam que cepas de EAggEC são capazes de produzir toxinas, genericamente chamadas de enterotoxina termolábil (LT) e enterotoxina termoestável (ST) de acordo com sua resistência térmica,

mas que são genética e imunologicamente diferentes das enterotoxinas produzidas por ETEC e interferem no metabolismo celular do enterócito, com ação na absorção de sais e eletrólitos. Parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (diarreia protraída) com sangue em 11% dos casos. Sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada (BHAN *et al.*, 1989; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Segundo HARRIGAN (1998), as cepas de *E. coli* difusivamente aderente (DAEC) não estão caracterizadas e MENG *et al.*, (2001) associam cepas com diarreia infantil e os dados disponíveis à sua patogenicidade são raros e que nenhum surto associado a alimento foi noticiado.

2.1.3 Riscos de infecção por *Escherichia coli*

A susceptibilidade a infecção por *E. coli* segue o exemplo habitual da idade, onde jovens e indivíduos susceptíveis às infecções sofrem grandes riscos. Infecções devidas às cepas de EPEC e ETEC são particularmente comuns na infância e sorotipos clássicos de EPEC usualmente associados somente com infecções em crianças com menos de 18 meses de idade. Nesta faixa etária, existe evidência de que o sexo masculino é mais susceptível que o sexo feminino (ANTAI & ANOZIE, 1987). As infecções por ETEC são somente, raramente, encontradas em áreas onde as infecções por EPEC estão presentes. Isto é provavelmente devido à competição dos dois microrganismos pelos mesmos sítios de ligação intestinal.

O primeiro surto de EHEC ocorreu nos EUA em 1982, onde a *E. coli* O157:H7 foi o agente determinante de colite hemorrágica (RILEY *et al.*, 1983). Embora a epidemiologia, das cepas EHEC não esteja completamente estabelecida, os indivíduos com faixa de idades extremas, crianças menores de cinco anos e idosos, são mais sensíveis (PAI *et al.*, 1988). A síndrome urêmica hemolítica é mais comum em crianças menores de 10 anos de idade com sintomas mais evidentes e elevada letalidade (ROBSON *et al.*, 1991; TARR, 1995) e em idosos. Isto pode refletir na adaptação do hospedeiro pelas cepas "Shiga-like" produtoras de toxina II, as quais são raras em pacientes com idade entre 16 e 61 anos (OSTROFF *et al.*, 1989). O risco de infecção

por EHEC é também aumentado pela gastrectomia, antibioticoterapia e agentes bloqueadores de H₂ (EDELMAN *et al.*, 1988).

Com exceção das cepas de EHEC, a prevalência da *E. coli* patogênica é maior em países onde os padrões gerais de higiene são precários. Conseqüentemente as cepas de ETEC são mais comuns e em muitos casos a principal causa das diarréias dos viajantes (PADHYE & DOYLE, 1992; SHUTERLAND *et al.*, 1995).

A diarréia infantil devido a EPEC foi anteriormente um problema em berçários onde a transmissão por funcionários, ou de criança para criança, pode ter sido importante veículo. Surtos ocorreram em berçários onde o controle diário não era rigoroso, mas em geral, onde há controle da higiene e em países desenvolvidos, a incidência de EPEC é baixa. Entretanto, o organismo ainda é a maior causa da mortalidade infantil. A alta incidência de EPEC significa que as crianças são expostas diretamente ao agente após a desmama. Crianças que consomem alimentos com formulação artificial são mais expostas ao risco que aquelas que se alimentam ao peito. Isto é comprovadamente devido a carência de água apropriada para reconstituir o alimento desidratado, embora a falha no desenvolvimento da microbiota intestinal protetora possa estar envolvida. Não existe dúvida que em países desenvolvidos a amamentação é mais divulgada (DUGUID *et al.*, 1978), porém os esforços dos educadores de saúde freqüentemente fazem pequeno impacto contra a propaganda sedutora das fábricas de alimentos infantis (VARNAM & EVANS, 1996).

O gado pode ser um importante reservatório de EHEC (MARTIN *et al.*, 1986; BORCZYK *et al.*, 1987) e o consumo de leite cru ou carne crua ou insuficientemente cozida tem sido definido como um fator de risco, uma particular associação a ser considerada é o consumo de hambúrgueres em lanchonetes. Todavia, a tese de que EHEC é uma zoonose transmitida por alimento foi recusada por WALMER & TOUWS (1990), que considerou insuficientes as evidências existentes, para implicar o gado como a origem do organismo na doença humana. Outras pesquisas tem sustentado o conceito de que o gado é incriminado como um reservatório (BRYANT *et al.*, 1989; MONTENEGRO *et al.*, 1990), mas que o risco esteja associado com algum tipo específico de alimento. Entretanto, existe uma associação entre infecção por EHEC e a

cocção e a manipulação imprópria dos alimentos (BRYANT *et al.*, 1989). A população alvo pode ser de qualquer faixa etária, sendo os mais susceptíveis os idosos e crianças menores de cinco anos, além de indivíduos imunodeprimidos ou com doenças renais (WEAGANT *et al.*, 1995).

2.1.4 Mecanismo de patogenicidade por cepas de *Escherichia coli*

A virulência das cepas de EPEC está associada à capacidade de adesão à mucosa do intestino (KAPER, 1987), à invasão das células epiteliais (DONNENBERG *et al.*, 1989; MILIDIS *et al.*, 1989) e à destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais, sendo esta adesão mediada por um plasmídeo (EAF) (FLETCHER *et al.*, 1990) responsável pela síntese de um fator de enteroaderência. Esse fator corresponde a uma proteína de 50 a 70 KDa, e promove um tipo de aderência ao enterócito denominada localizada (AL), que é característica de EPEC, uma vez que outras cepas de *E. coli*, quando aderem ao enterócito, têm modelo de aderência chamada difusa (AD) (SCALETSKY *et al.*, 1984; KNUTON *et al.*, 1987; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Estudos de microscopia eletrônica têm demonstrado que cepas de EPEC são capazes de induzir profundas alterações no citoesqueleto das células epiteliais, com destruição das microvilosidades e acúmulos de actina no local de adesão. Esse efeito, denominado "attachment and effacement", é característico de EPEC e causado por uma proteína de 94KDa, chamada intimina, cuja produção é mediada por um gene cromossomal chamado *eae* ("*Escherichia coli* attaching and effacing"). Quando esse gene está ausente, não há destruição das microvilosidades, indicando que os genes *eae* e *eaf* são interdependentes (LEVINE *et al.*, 1985; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Embora sejam relatadas a produção de enterotoxina termolábil (LT) e enterotoxina termoestável (ST) por EPEC, para VARNAM & EVANS (1996), tais afirmações se devem provavelmente a incompleta caracterização dos sorogrupos de EPEC e BOUZARI & VARGHESE (1990), sugeriram que o grupo EPEC não produz enterotoxinas, ainda que possa causar diarreia, sendo o fator de aderência mediado por plasmídios e que algumas cepas elaboram uma toxina dilatadora citoletal (TDCL).

EHEC tem o mecanismo de patogenicidade relacionado com a produção de citotoxinas denominadas verotoxinas (VTs), cuja atividade biológica pode ser observada em culturas de células Vero, provenientes de rim de macaco verde africano, podem ainda ser chamadas toxinas “Shiga like” (SLTs), pois são semelhantes àquelas produzidas pelo bacilo Shiga (*Shigella dysenteriae*, tipo 1), causador da disenteria bacilar (O'BRIEN *et al.*, 1982; WEAGANT *et al.*, 1995). São proteínas de alto peso molecular, sendo conhecidas as variantes VT-I (ou SLT-I) e VT-II (ou SLT-II) sendo a primeira neutralizada pela toxina anti-shiga enquanto que a segunda não reage (SCOTLAND *et al.*, 1985). Posteriormente, foi verificado que a verotoxina relacionava-se intimamente, em termos de estrutura e função com a toxina Shiga (*stx*) produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, sendo então proposto o nome de “shiga-like toxins” (SLT) para identificar estas toxinas (O'BRIEN & HOLMES, 1987). A dupla nomenclatura (VT/SLT) adotada para referir-se à toxina e suas variantes fez com que CALDERWOOD *et al.* (1996), propusessem uma nova nomenclatura, reconhecendo essas toxinas como pertencentes a família das toxinas Shiga (*stx*). Nesta nomenclatura, as *E. coli* que portam o gene *stx* ou elaboram *stx* são referidas como STEC (“Shiga toxin-producing *Escherichia coli*”). A produção destas é determinada por dois fagos lisogênicos distintos. Recentemente foi descrita a VT-III. As citotoxinas possuem duas subunidades, sendo uma delas responsável pela ligação à fração 60S dos ribossomos dos enterócitos, inibindo a síntese protéica. EHEC possui um gene cromossomal denominado *eae*, responsável pelas alterações do citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local de adesão. Verifica-se ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades, com eliminação de sangue nas fezes. Embora a *E. coli* do sorotipo O157:H7 seja a mais estudada, cepas de *E. coli* pertencentes a diversos outros sorotipos já foram descritas como produtoras de citotoxinas (FRANCO & LANDGRAF, 1996). As cepas de *E. coli* produtoras de verotoxina pertencem a diferentes grupos sorológicos, mas apenas as linhagens associadas à colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (SUH) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (JOHNSON *et al.*, 1983; KARMALI *et al.*, 1983;

KARMAL *et al.*, 1985; RILEY, 1987; O'BRIEN & HOLMES, 1987; KARMALI, 1989; CAPRIOLI *et al.*, 1992) são do sorotipo O157:H7 (WILLSHAW *et al.*, 1993).

Em conformidade com outras cepas de sua espécie, a O157:H7 tem seu “habitat” no solo, água contaminada e material em decomposição. Seu reservatório principal é o trato gastro-intestinal de bovinos, embora também já tenha sido isolada do trato intestinal de suínos e aves (MARKS & ROBERTS, 1993; MENG *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1997). Foi descrito um novo tipo de *E. coli* produtora de hemolisina (enterohemolisina) sendo encontrada em 90% das cepas EHEC, porém a patogenicidade da enterohemolisina não é conhecida, entretanto sua produção é usada como marcador genético (VARNAM & EVANS, 1996). Algumas cepas EHEC isoladas de animais produzem ST ou LT além de SLT mas a produção de ST ou LT não foi descrita em cepas humanas (SMITH *et al.*, 1988).

A cepa denominada FEEC para JAY (1994), está aparentemente associada a surtos esporádicos de diarreia e por não ter sido provada a sua existência, muitos autores deixam de mencioná-la. *E. coli* enteroagregativas são cepas patogênicas recentemente descritas, existindo poucos dados ao seu respeito. Sua patogenicidade parece estar relacionada com a adesão à mucosa intestinal, cujo modelo de adesão é diferente daquele apresentado por EHEC, EPEC ou EIEC. A adesão ocorre principalmente no cólon, não sendo observada no íleo ou no duodeno, e é manose resistente. A adesão é mediada por fímbrias que são, na verdade, um conjunto de microfibrilas associadas em feixes, denominados BFP (“bundle forming pilus”) que são diferentes das outras fímbrias de adesão. Alguns relatos indicam que cepas de EA_gEC são capazes de produzir toxina, genericamente chamadas LT e ST de acordo com sua resistência térmica, mas são genética e imunologicamente diferentes das enterotoxinas produzidas por ETEC. Sabe-se também que EA_gEC interfere no metabolismo celular do enterócito, com ação na absorção de sais e eletrólitos que parece estar associada com casos crônicos de diarreia (diarreia protraída). Entretanto, sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada (FRANCO & LANDGRAF, 1996). As cepas são auto-aderentes, tendem à auto-aglutinação, sob microscopia apresentam-se empilhadas. Suas características sorológicas, e as causas

clínicas da doença precisam ser completamente descritas (VARNAM & EVANS, 1996; HARRIGAN, 1998). A maioria das cepas testadas possuem plasmídeos de transferência de 55 a 65 MDa; em umas das cepas, o plasmídeo, é acompanhado de polissacarídeo, fímbria de expressão, com propriedades agregativas (VIAL *et al.*, 1988). Lesões histopatológicas distintas são produzidas nos enterócitos das extremidades e laterais das vilosidades, destruindo-as e tornando-as severamente ásperas. O núcleo apresenta o tecido conectivo desnudo permanecendo com a superfície hemorrágica (BHAN *et al.*, 1989). O envolvimento de uma toxina, possivelmente “Shiga-like” tem sido postulada, porém sem evidências (VARNAM & EVANS, 1996).

Tabela 1: Sumário das cepas de *Escherichia coli* diarreio gênicas

CATEGORIA	SOROGRUPOS	FATORES DE VIRULÊNCIA
Enteropatogênica Categoria I	O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142	Produção de toxina “shiga”? Fímbria ou membrana protéica externa de adesão em algumas cepas.
Categoria II	O18, O44, O112, O114	
Enterotoxigênica	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167	Toxinas termolábeis e termoestáveis. Fatores de adesão
Enteroinvasiva	O28ac, O29, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167	Invasão epitelial
Enterohemorrágica	O26 ¹ , O157, O111	Altos níveis da toxina “shiga”. Fimbrias de adesão
Enteroaderente - agregativa	Não definido	Aderência epitelial. Produção de toxina?

¹Sorogrupo O26 foi originalmente categorizado como enteropatogênico, mas é atualmente considerado enterohemorrágico. Fonte: Varnam, E.H. & Evans, M.G. Foodborne Pathogens. An illustrated text. Manson Publishing, p.103, 1996.

2.1.5 Epidemiologia

Atualmente, em países desenvolvidos, EPEC é isolada em surtos esporádicos com frequência muito baixa em casos de diarreia endêmica. Entretanto, em países em desenvolvimento, principalmente nos localizados em zona tropical EPEC está entre os principais agentes enteropatogênicos, especialmente, na diarreia dos lactentes, com altos índices de mortalidade. No Brasil, EPEC é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses, com predominância dos sorotipos O111:[H-], O111:[H2], O119:H6 e O55:H6. Entretanto, crianças com idade superior a um ano raramente são afetadas. Estudos recentes têm demonstrado que infecções por EPEC podem estar associadas com diarreia crônica. Nos anos 60-70, diversos surtos causados pelo consumo de água e/ou de alimentos contendo EPEC foram registrado, em diversas partes do mundo. Esses surtos estavam associados com cepas pertencentes principalmente aos sorogrupos O86 e O111, envolvendo tanto crianças quanto adultos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O bovino é considerado reservatório natural de EHEC, razão pela qual os alimentos de origem animal principalmente a carne bovina parecem ser o principal veículo desse patógeno. Inúmeros surtos se referem ao consumo de carne bovina mal cozida e diversos produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres, salsichas tipo “hot dog”), leite cru, vegetais consumidos crus, molhos preparados para saladas, maionese, e ainda cidra de maçã recém processada, implicada no surto ocorrido em Massachussets, 1993, onde maçãs contaminadas com adubo orgânico foram utilizadas no processamento da bebida (BRYANT *et al.*, 1989; GRIFFIN & TAUXE, 1991; BELONGIA *et al.*, 1993; MENG *et al.*, 1994; MILLER & KASPAR, 1994).

2.2 *Escherichia coli* enteropatogênica

CONTEY & BLAKE (1977), estudando a *E. coli* O15 (RDEC-1) isolada de diversos coelhos com diarreia se propuseram a verificar: (1) se a linhagem poderia produzir diarreia quando administrada pela via oro-gástrica e (2) se esta linhagem era

invasiva ou enterotoxigênica. A linhagem RDEC – 1 produziu diarreia em 48 dos 62 coelhos quando foi dada pela via oro-gástrica, em doses que variam de $1,5 \times 10^2$ a 4×10^{10} bactérias. Foi provado que a *E. coli* pode produzir diarreia sem ser capaz de invadir a mucosa ou sintetizar enterotoxinas. Linhagens de *E. coli* similares a RDEC –1, podem responder por algumas das diarreias que ocorrem em humanos associadas a *E. coli*.

HADAD et al,(1982), verificaram que em bezerros alimentados com colostro ,os quais foram posteriormente alimentados com substituto do leite, contendo uma densidade de 10^{11} células de EPEC, ocorreu uma colonização das porções mediana e caudal do intestino delgado, e nestas áreas, 80% dos organismos estavam associados com a parede do intestino, enquanto que as *E. coli* não enteropatogênicas (NEEC), falharam em colonizar o intestino delgado ou em estar associadas a ele. Os estudos em microscopia de luz demonstraram uma camada de *E. coli* enteropatogênica aderente a superfície da mucosa do jejuno e íleo de bezerros infectados e também demonstraram vilosidades engrossadas, atrofiadas e fundidas com a lâmina própria pelo infiltrado inflamatório. Foram observadas também mudanças na topografia da superfície das células das vilosidades e exposição da lâmina própria em amostras tiradas após a morte dos bezerros.

MOON & WHIPP (1983), mostraram que três linhagens de *E. coli* enteropatogênica, originalmente isoladas de humanos e que haviam sido demonstradas como sendo causadoras de diarreia em voluntários humanos por mecanismos desconhecidos e também uma linhagem de EPEC de coelho, apresentaram a capacidade de se ligarem intimamente e se desprender das microvilosidades e do citoplasma das células epiteliais intestinais nos intestinos de coelhos e suínos. As atividades de adesão e desprendimento destas EPEC foram demonstradas por exames de microscopia de luz, através de cortes histológicos e também por microscopia eletrônica de varredura. Os autores privaram do colostro tanto os suínos como os coelhos, para detectarem a EPEC nas vilosidades intestinais e verificaram que as lesões (ligações e desprendimento), produzidas pela EPEC são multi-focais, com variações de animal para animal em resposta à algumas linhagens de EPEC. As

linhagens de EPEC, também variaram de frequência e extensão da lesão produzida no intestino dos animais.

PEETERS et al.,(1988), trabalharam com 568 linhagens de *E. coli* isoladas de coelhos saudáveis e de coelhos com diarreia, as quais foram separadas em 11 biótipos diferentes de acordo com os modelos de fermentação de 4 carboidratos. Algumas linhagens induziram lesões características de *E. coli* de adesão e desprendimento (AEEC). Elas se ligaram ao epitélio do intestino delgado terminal e do intestino grosso de coelhos com 5 semanas de idade e após infecção experimental, causaram desprendimento das bordas pregueadas das células das microvilosidades. Entretanto nesse estudo, a patogenicidade para coelhos desmamados, julgada pelo quadro de diarreia, anorexia e reduzido ganho de peso, variou de acordo com os biótipos das linhagens.

Para VALLANCE & FINLAY(2000), diversos patógenos desenvolveram várias maneiras para infectar seus hospedeiros e causar doenças, incluindo a subversão e exploração de alvos em células hospedeiras. Um microrganismo deste tipo é a *E. coli* enteropatogênica (EPEC). A causa mais comum de diarreia infantil em países em desenvolvimento. A etapa fundamental de virulência das EPEC é a colonização do epitélio intestinal. Após a aderência inicial, EPEC causa uma obliteração localizada de microvilosidades e uma aderência íntima na célula hospedeira de superfície, apresentando características de adesão e lesões (A/E). Considerado um protótipo para a família de bactérias causadoras de lesões A/E, a EPEC tem revolucionado nosso conhecimento e de como esse patógeno infecta seus hospedeiros e ainda causar uma doença. Íntima aderência requer uma secreção tipo III-mediadora de proteínas bacterianas, sendo que algumas são translocadas diretamente dentro das células dos hospedeiros infectados, incluindo seus receptores (Tir). A translocação de proteínas de EPEC também ativam sinais em células abaixo do epitélio, causando uma reorganização do citoesqueleto actínico do hospedeiro e a formação de estruturas como pedestais em posição inferior a aderência bacteriana.

Nos estudos de PHILLIPS & FRANKEL (2000), a adesão é a característica marcante das *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e das EPEC nas células hospedeiras

humanas cultivadas. Recentemente foi demonstrada a indução de lesões A/E em intestinos humanos por cepas EHEC 0157: H7. Ao contrário da EPEC, que colonizou o intestino delgado, a adesão de EHEC foi restrita ao epitélio foliculo-associado (FAE) nas placas de Peyers. A complementação do gene *eae* em CVD206 (derivado da cepa EPEC E2348/69) com EPEC *eae- α* (codifica íntimina- α) restaurou a habilidade da bactéria de colonizar a mucosa do intestino delgado. A complementação com EHEC *eae- γ* (codifica íntimina- γ) resultou em uma cepa aderida e induzindo lesões A/E em placas de Peyers, similar a EHEC.

No estudo de KREJANY et al. (2000) foi descrito que cepas de *E. coli* enteropatogénicas (REPEC) sorotipo O103:H2 que produzem lesão A/E em coelhos são uma importante causa de diarreia em filhotes em desmame. Assim como em humanos, as cepas REPEC, possuem o "locus" de aderência com genes envolvidos na formação de lesões A/E. Em estudo histológico de células intestinais de coelhos infectados com esta bactéria foi possível verificar a presença de células de inflamação na lâmina intestinal.

CORREA & MARIN (2001) descreveram a coleta de 2144 amostras de leite de mastite bovina e o isolamento de 182 cepas de *E. coli* em 141 destas cepas foi possível determinar o antígeno somático (sorogrupo). Doze sorogrupos diferentes foram identificados entre eles O26, O55, O111 e O119, todos eles são sorogrupos EPEC clássicos. Estes sorogrupos representaram 40.0% do número total de cepas isoladas. Vinte das 57 cepas testadas apresentavam o plasmídeo, nove cepas foram positivas para o gene *EaeA* e o fator de aderência (EAF) de EPEC, duas cepas foram negativas para o gene *EaeA* mas positivas para o gene EAF.

2.3 Camundongo como modelo experimental de infecção

MELTON-CELSA et al.(1996), nos seus estudos prévios demonstraram que cepas de *E. coli* enterohemorrágica 091: H21 cresceram em um alto nível em muco de intestino delgado e colon de camundongos e demonstraram que o crescimento está relacionado à virulência. Neste trabalho foi mensurado o nível de toxina Shiga-Like (SII-

II) produzida pela *E. coli* 091:H2 1 através do contato com o muco intestinal de camundongo. Os resultados mostraram que tanto o muco intestinal de camundongo como o de humano, ativam diretamente a produção de toxina Shiga-Like. A toxina Shiga Like SLT-II (variante), se torna ativada e mais citotóxica, depois da incubação com muco intestinal de camundongo ou de humano.

WALDOLKOWSKI et al.(1998), analisaram a atividade da *E. coli* F-18 e a F-18 col em colonizar o intestino grosso de camundongos tratados previamente com estreptomicina. Os autores verificaram que o aparecimento de possíveis adesões da *E. coli* F-18 e F-18 col a receptores específicos em células produtoras de muco podem ter uma importante relação com a capacidade de colonização no intestino grosso de camundongos tratados com estreptomicina. O que ocorre é a predominância de *E. coli* F-18 em relação a F-18 col, devido à competição de ambos pelo mesmo receptor.

MUSHIN & DUBOS (1965), verificaram os fatores que afetam a colonização experimental de camundongos com *E. coli* O26: K60 frente à sobrevivência de bactérias coliformes normalmente presentes no trato gastrointestinal de camundongos normais. O fato de que os coliformes da microbiota normal não são eliminados, mas sim apenas temporariamente suprimidos pela introdução da linhagem de *E. coli* O26: K60 testada, pode ser essencial para identificar os sorotipos prevalentes em cada tempo do curso da colonização experimental. Isto comprovou a diferença entre linhagens de coliformes residentes e transitórias nas colônias da microbiota normal de camundongos e foi observada a presença de outras bactérias gram negativas, aeróbias facultativas.

Nos trabalhos de PUNYASHTHITI et al. (1971), Estudos avaliando a enteropatogenicidade de *E. coli* extraídas de diarreia humana na alça intestinal de camundongos, oferece mais vantagens do que o modelo em coelhos devido ao espaço utilizado ser mais conveniente, ser mais acessível financeiramente e mais fácil de se avaliar os resultados, Além disto o modelo de coelho não se apresenta confiável em relação à reprodutibilidade dos resultados com linhagens de *E. coli*.

LINDGREN et al. (1993), verificaram que a *E. coli* K-12 produz altos níveis de toxina Shiga-like tipo II, mas não de Shiga-like tipo I em modelos de camundongos tratados com estreptomicina. Neste trabalho os autores testaram a virulência de várias

E. coli enterohemorrágicas que produzem SLT-II, isoladas de pacientes com colites hemorrágicas. Todas as linhagens testadas foram capazes de colonizarem o intestino de camundongos, entretanto apenas 2 linhagens foram virulentas para os camundongos. Secções histológicas do intestino de camundongos alimentados via oral com a linhagem 091: H21 demonstraram extensiva necrose renal tubular, entretanto resultados hematológicos não foram consistentes com um diagnóstico de Síndrome Urêmica Hemolítica. Neste trabalho foi identificado 2 isolados de *E. coli* enterohemorrágica que produzem Shiga-like que são altamente patogênicas quando infectados oralmente em camundongos tratados com estreptomicina. Estes estudos indicaram que a morte de 50% dos camundongos são derivados à associação da produção de SLT-II/IIc, porém a produção de uma única toxina sozinha é insuficiente para explicar a alta virulência neste modelo .

Nos estudos de LINDGREN et al.(1993) , verificaram linhagens de *E. coli* enterohemorrágica que produzem toxina Shiga-Like tipo I, tipo II ou ambas, as quais apresentam citotoxicidade distintas imunologicamente. O trabalho dos autores comparou a letalidade de *E. coli* administrada oralmente que produz diferentes níveis de citotoxina de SLT-II, SLT-II VHA (clonado de B2F1), SLT-II VHb (também clonado de B2F1) ou SLT-IIc clonado de EHCC 0157: H7 linhagem E32511 em células Vero. Estes achados não suportam a idéia de que B2 F1 é unicamente virulenta por causa da toxicidade em vivo do SLT- II- related, mas sim por demonstrar diferenças da atividade de citotoxicidade (células Vero) entre o grupo de STL-II produzido por *E. coli* enterohemorrágica isolada de humanos.

3. OBJETIVOS

Este trabalho descreve uma tentativa de modelo de colonização do intestino delgado de camundongos recém-nascidos e não tratados previamente com antibióticos, por cepas enteropatogênicas de *E. coli* de origem bovina e proveniente de diarreia humana , através de análises de cortes histológicos por microscopia de luz.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens de EPEC

Cinco linhagens de EPEC foram utilizadas: linhagem humana(Adolfo Lutz) 1-) EPEC padrão CDC 3111-90 *ea*e+, *EAF*+/- ; linhagem patogênica 2-) 537-1- linhagem EPEC-like *ea*e+, *EAF*+; linhagem patogênica 3-) 263 - linhagem EPEC-like *ea*e+, *EAF*+; linhagem patogênica 4-) 304-3 *ea*e-, *EAF*+; linhagem patogênica 5-) 988-2 *ea*e-, *EAF*+,

Todas as linhagens patogênicas isoladas são originárias do leite mastítico de bovinos e foram obtidas em um outro trabalho (CORREA & MARIN, 2002) e gentilmente foram cedidas para este trabalho. Estas linhagens foram mantidas no laboratório de genética, FORP/USP em caldo Luria (L. broth) e Luria ágar (L. ágar), estes meios foram utilizados para manter as bactérias viáveis e quando necessário o meio cultura McConkey (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) também foi utilizado. O crescimento bacteriano em L. broth foi mantido em 37°C por 16 h com agitação. As contagens viáveis das colônias bacterianas foram determinadas pela contagem em meio ágar.

4.2 Animal e infecção

Os cruzamentos entre os camundongos do tipo Suíços “*Mus musculus*”, foram realizados no laboratório. As fêmeas que estavam prenhas foram separadas e após 19 dias de gestação (prazo do início ao fim da gestação de camundongos) os animais nascidos vivos foram pesados e selecionados de acordo com o peso. Trinta e seis

animais foram selecionados, colocados em gaiolas separadas e mantidos por 20 dias, pois se tornou impraticável a obtenção dos cortes histológicos devido ao diminuto tamanho do fragmento de textura gelatinosa impossibilitando a inclusão destes fragmentos nos blocos de parafina. Depois de decorrido este período a inoculação das estirpes foi realizada nos animais tanto por via oral onde se utilizou a sonda gástrica como também 100 µl da suspensão foi injetada intraperitonealmente. A dose administrada para cada uma das cepas de *E. coli* enteropatogênica foi de 1,0 ml de uma suspensão de 10^8 cel/ml (MOON et al.,1983) das culturas das diferentes cepas.

Após a infecção, somente água foi oferecida ao longo do dia para os camundongos e estes foram observados quanto à ocorrência de diarreia. Para cada linhagem da bactéria e via de administração foram utilizados três animais. Nos animais controle, foi utilizada 0,5 ml de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.

4.3 Exame histológico

Após cinco horas da administração das linhagens, os animais foram eutanasiados por inalação excessiva de éter dietílico. A seguir, os corpos dos animais inteiros, foram fixados em solução de formalina a 10%, por um período de 48 horas. Decorrido o período de fixação os corpos dos animais foram lavados com água corrente e submetidos a uma incisão abdominal, no sentido vertical para que permitisse o acesso às suas víceras.

Assim então o intestino delgado foi identificado em sua porção inicial e cuidadosamente distendido para que os conteúdos permanecessem em posição. Do segmento do intestino removido foi separado uma fração distal (íleo).

Estas peças de fragmentos de tecido foram processadas através dos métodos mais comuns utilizados em histologia, que permite a obtenção de preparados histológicos permanentes, neste instrumento os objetos são observados por transparência já que os órgãos estudados são muito delicados e extremamente finos (6 micrômetros).

4.4 E tapas da preparação de lâminas histológicas

De acordo com JUNQUEIRA & CARNEIRO(1995), as etapas para confecção de lâminas histológicas estão descritas a seguir

FIXAÇÃO: estabiliza os tecidos a fim de evitar a destruição por suas próprias enzimas. O fixador utilizado foi o formol a 4% em solução tamponada por 12 horas.

DESIDRATAÇÃO: extração da água dos tecidos pela passagem dos mesmos em concentrações crescentes de etanol, começando com álcool 70% e terminando com o álcool absoluto com duração de 8 horas.

CLAREAMENTO: nesta etapa o etanol é substituído por um líquido miscível com a parafina. O líquido utilizado foi o xilol, por um período de três horas, onde os tecidos tornaram-se translúcidos.

IMPREGNAÇÃO: para a obtenção dos cortes, os tecidos são embebidos e envolvidos por uma substância de consistência firme. A substância utilizada no experimento foi a parafina fundida em estufa a 60 graus celcius por um período de 4 horas, nesta etapa devido ao calor, o xilol evapora e os espaços anteriormente ocupados por ele são ocupados pela parafina, que penetra nos vasos, nos espaços intercelulares e no interior das células, tornando o fragmento de tecido mais fácil para ser levado ao micrótomo .Em seguida, colocou-se o tecido num recipiente de forma retangular contendo um pouco de parafina fundida e deixou-se solidificar a temperatura ambiente, formando um bloco de parafina com o tecido no seu interior. Um bloco de parafina foi utilizado para cada animal em estudo e estes foram seccionados obtendo-se o segmento envolvendo a parte do estômago e a porção inicial do intestino de modo a oferecer cortes transversais e longitudinais pela navalha do micrótomo. Estes foram estirados em água quente e, depois colocados na lâmina.

COLORAÇÃO: a coloração mais utilizada na rotina em histologia é a hematoxilina-eosina (HE), e foi esta a utilizada para a visualização dos componentes teciduais.

Após estes procedimentos as lâminas foram levadas para a microscopia óptica onde os tecidos foram examinados e fotografados, nos seus cortes e aspectos mais importantes.

5. RESULTADOS

Cinco linhagens de EPEC foram utilizadas: linhagem 1- EPEC padrão CDC 3111-90 *eae+*, *EAF+*- origem humana; linhagem 2- 537-1- linhagem EPEC-like *eae+*, *EAF+*; linhagem 3- 263 - linhagem EPEC-like *eae+*, *EAF+*; linhagem 4- 304-3 *eae-*, *EAF+*; linhagem 5- 988-2 *eae-*, *EAF+*,

Nos animais usados como controle (fig.2 e 3), foram administrados 0,5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e foram realizados os procedimentos histológicos padrões.

Animal controle. Corte longitudinal.

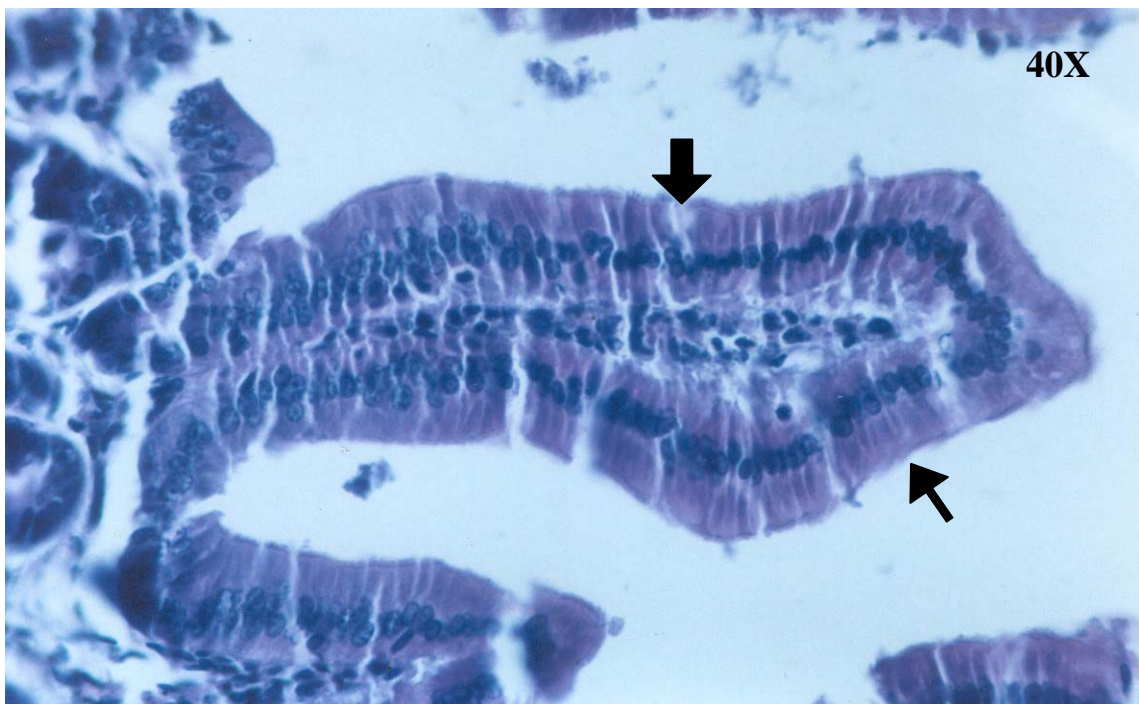


Figura 2: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, sem a presença de alterações histológicas e patológicas. Seta grossa: célula caliciforme, seta fina enterócitos.

Animal controle. Corte transversal.

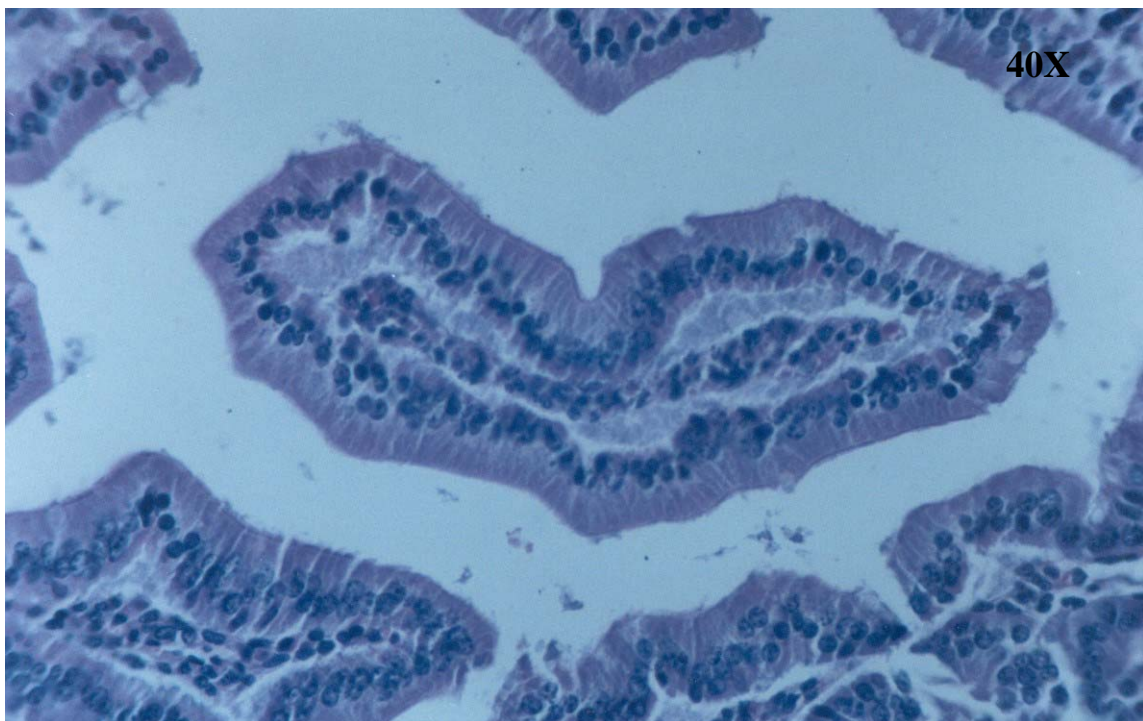


Figura 3: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, sem a presença de alterações histológicas e patológicas.

As secções histológicas dos cortes longitudinais e transversais das linhagens 1, 2 e 4 (fig. 4, 5, 6 e 7, 8 e 9 respectivamente), observadas em microscopia luminosa não evidenciaram a presença de colite, pois os epitélios das cepas em questão se mostraram de forma íntegra, apesar de que, linhagens *de E. coli* que não apresentavam mecanismos patogênicos, são capazes de se aderirem ao epitélio sem causarem diarreia ou sem serem capazes de invadir a mucosa.

Linhagem 1: EPEC padrão, corte longitudinal.

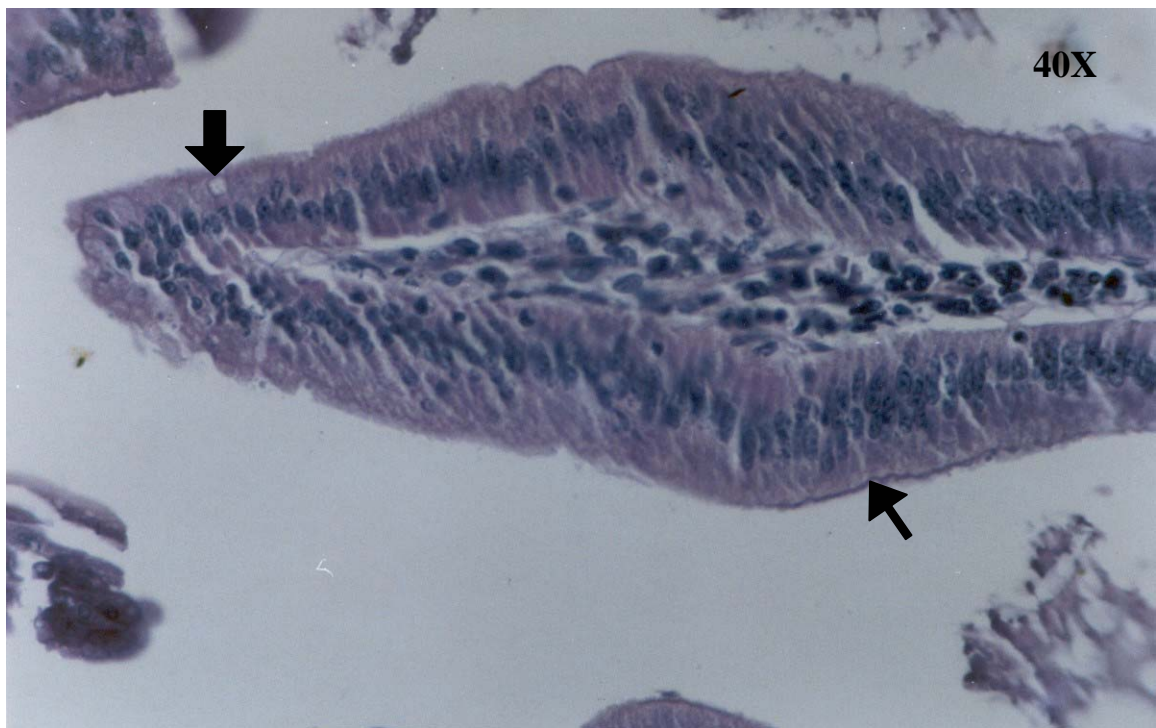


Figura 4: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, Apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta grossa: célula caliciforme, seta fina enterócitos.

Linhagem 2 patogênica: 537-1 corte longitudinal.

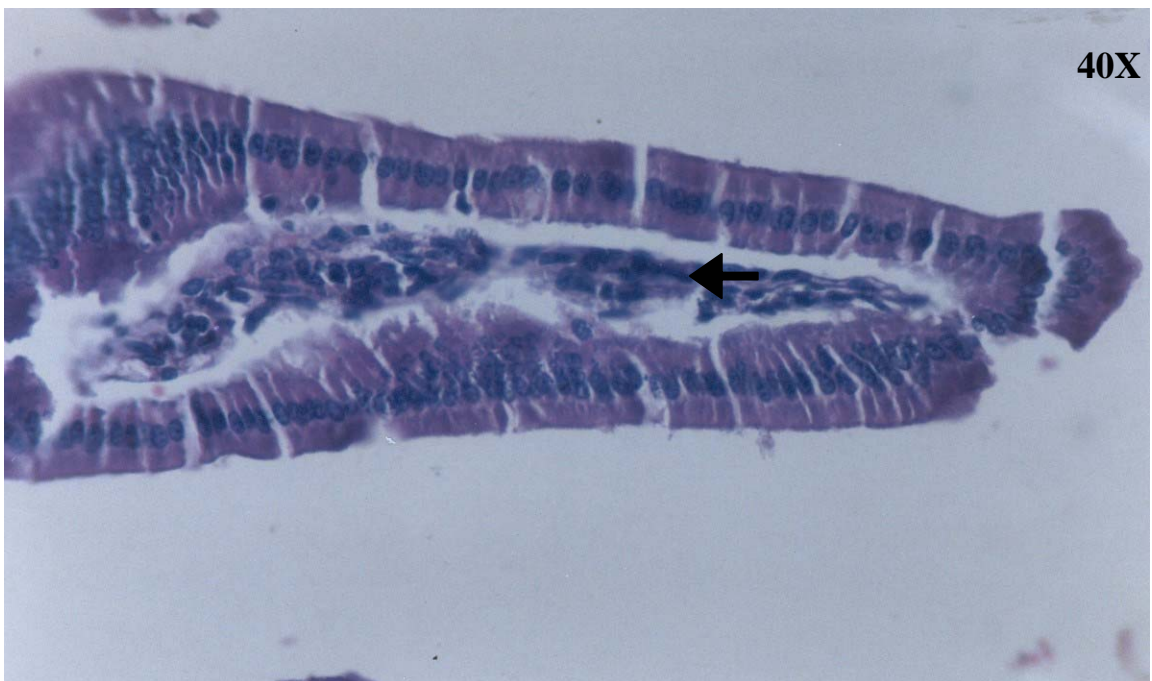


Figura 5: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, Apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta: lâmina própria.

Linhagem 4: patogênica 304-3 corte longitudinal.

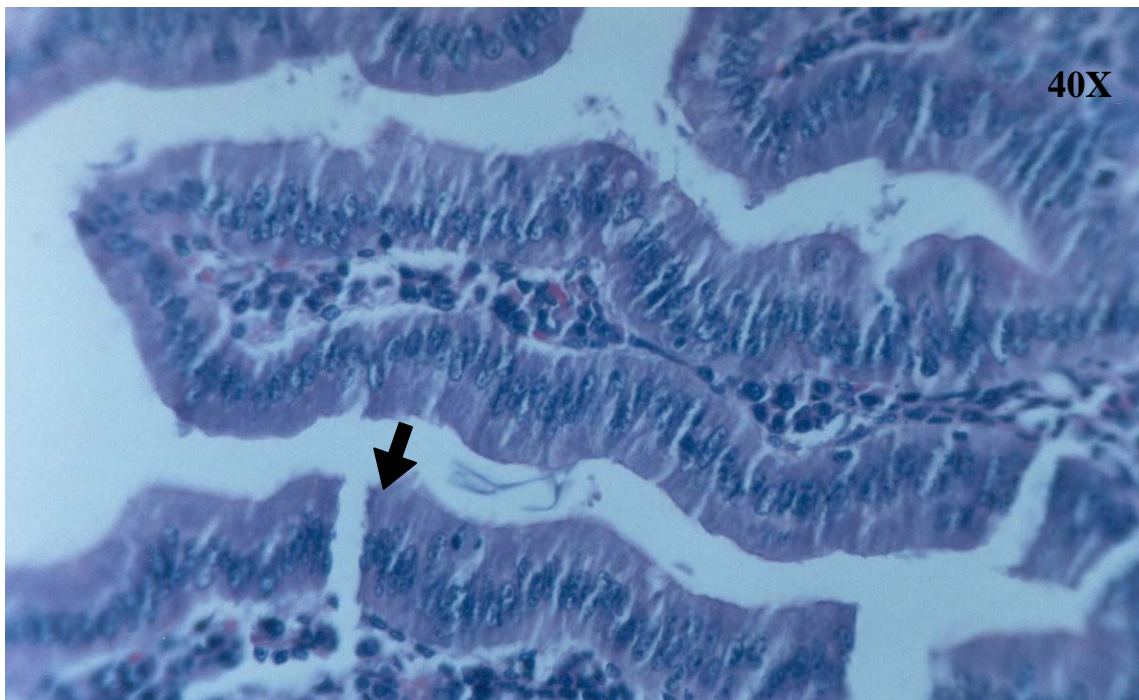


Figura 6: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta: artefato de técnica.

Linhagens 1, 2 e 4. Apresentaram epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório (figs. 7, 8 e 9)

Linhagens 1: EPEC padrão CDC 3111-90 corte transversal.

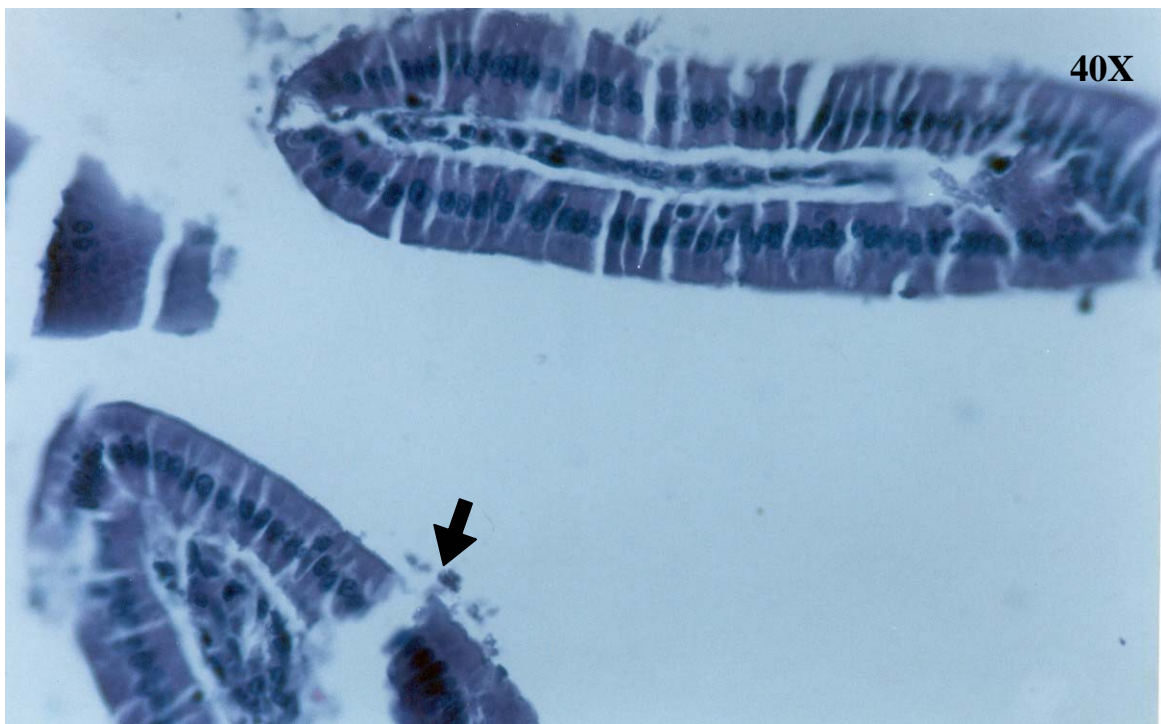


Figura 7: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias, apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Seta: artefato de técnica.

Linhagem 2 patogênica: 537-1 corte longitudinal.

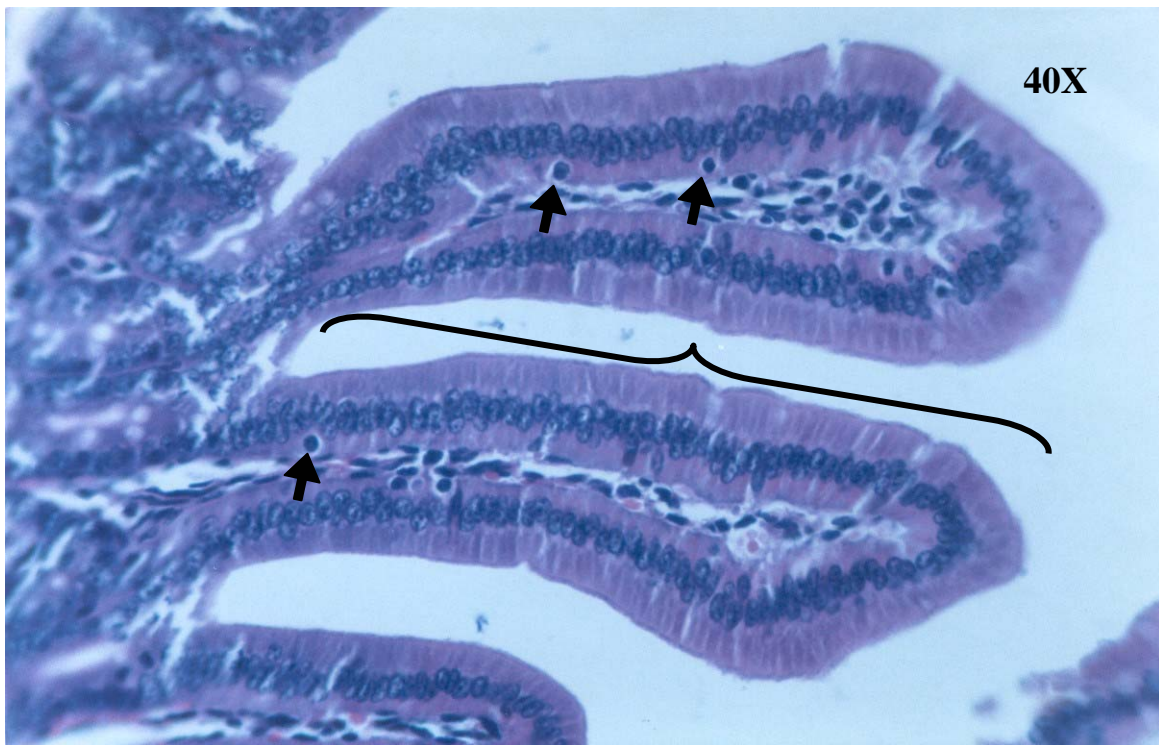


Figura 8: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, apresentou epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório. Chave: identifica um vilão; setas: linfócitos.

Linhagem 4 patogênica: 304-3 corte longitudinal.

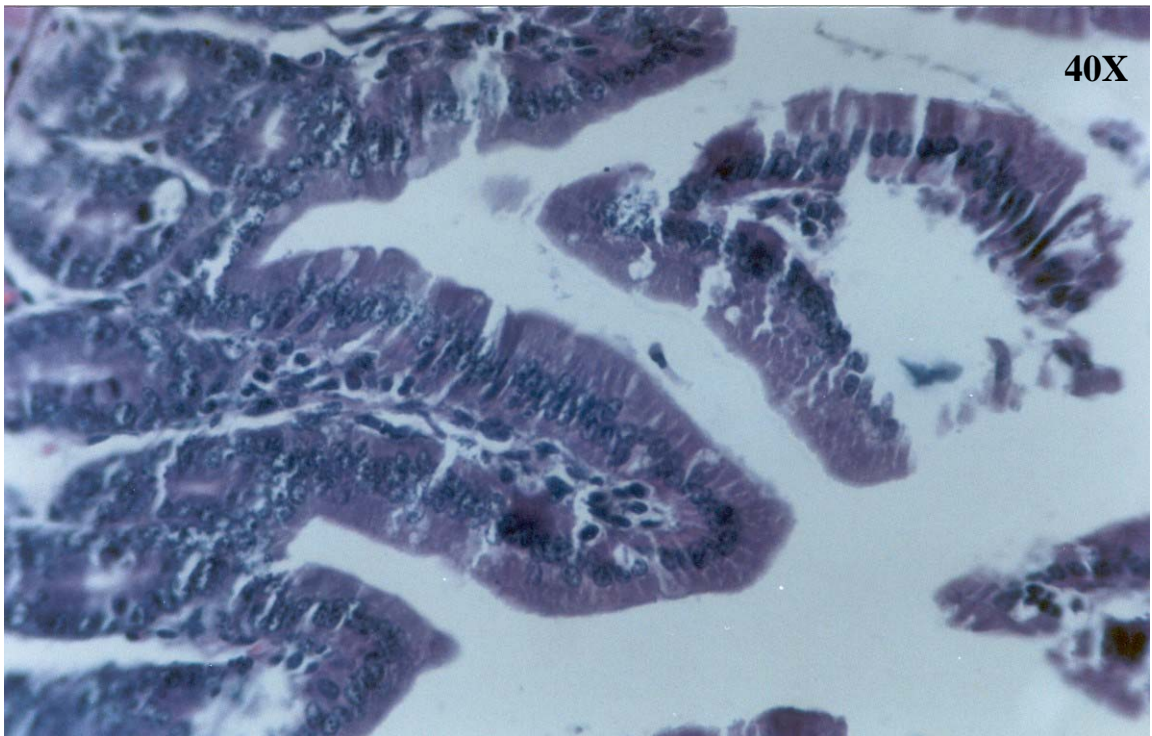


Figura 9: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, epitélio das vilosidades intestinais com bordas regulares e lâmina própria sem infiltrado inflamatório.

Das 5 cepas utilizadas, as linhagens de números 3 e 5 (fig. 10, 11 e 12), apresentaram alterações observadas em microscopia de luz, enquanto que as linhagens de números 1, 2, 4 e controle não mostraram alterações.

Nas cepas de números 3 e 5, a partir da secção histológica do corte longitudinal, observamos degeneração epitelial focal e infiltrado inflamatório, caracterizado por uma lesão tipo atachamento e disprendimento(attaching- effacing) devido à erosão irregular do epitélio da mucosa intestinal.

Linhagem 3 patogênica: 263 corte longitudinal.

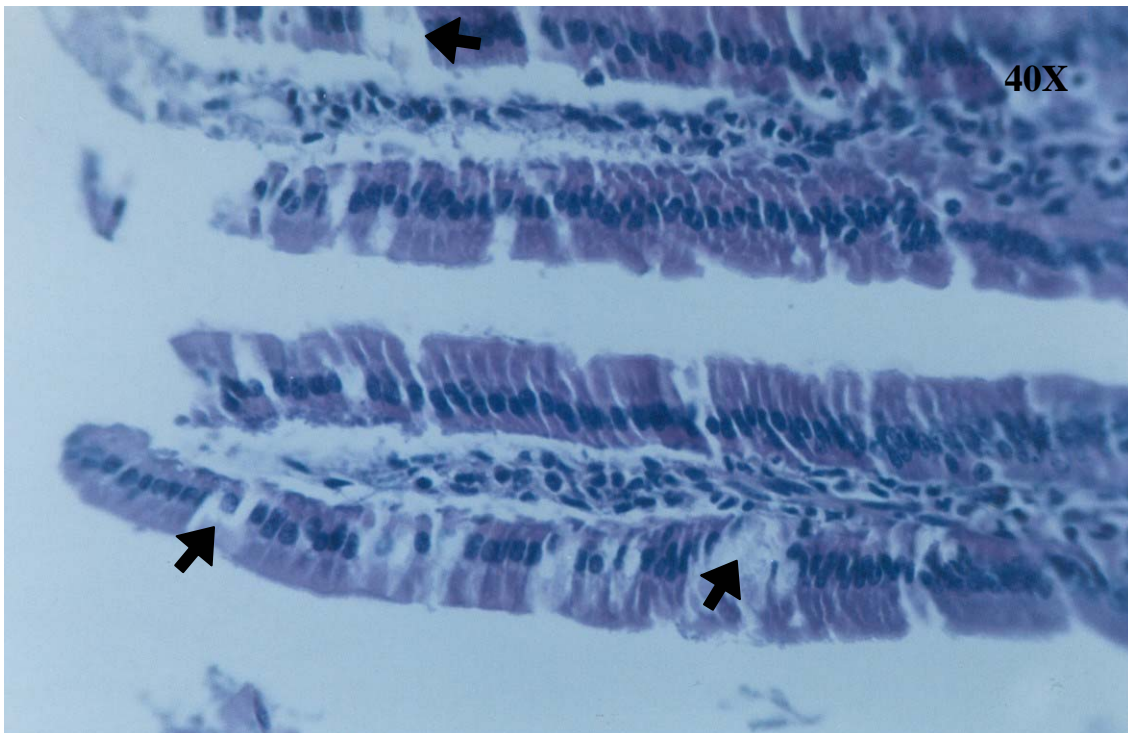


Figura 10: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “Mus musculus” com 20 dias. A camada superficial está rompida em vários locais e apresenta contorno irregular com presença de infiltrado inflamatório. Seta: rompimento da superfície do epitélio.

Linhagem 5 patogênica: 988-2 corte longitudinal.

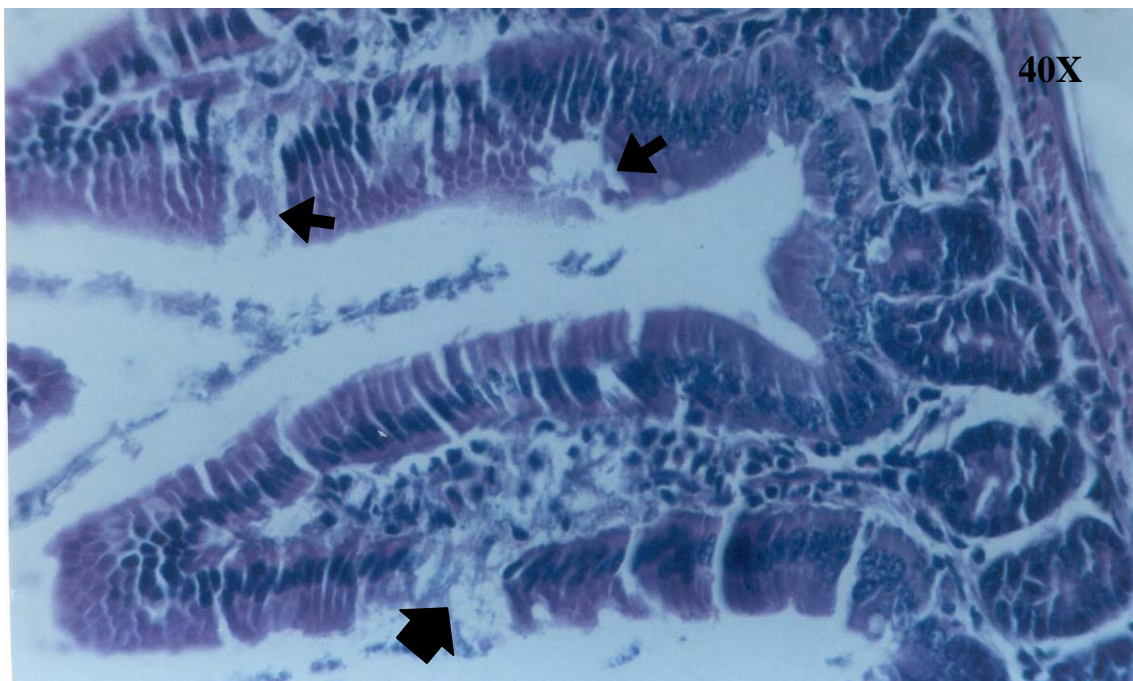


Figura 11: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, apresentou rompimento e contorno irregular das células epiteliais das vilosidades intestinais, chegando a atingir a lâmina própria, a qual apresentou infiltrado inflamatório. Setas finas, rompimento do epitélio; seta grossa rompimento do epitélio com invasão da lâmina própria.

Linhagem 5 patogênica: 988-2 corte transversal.

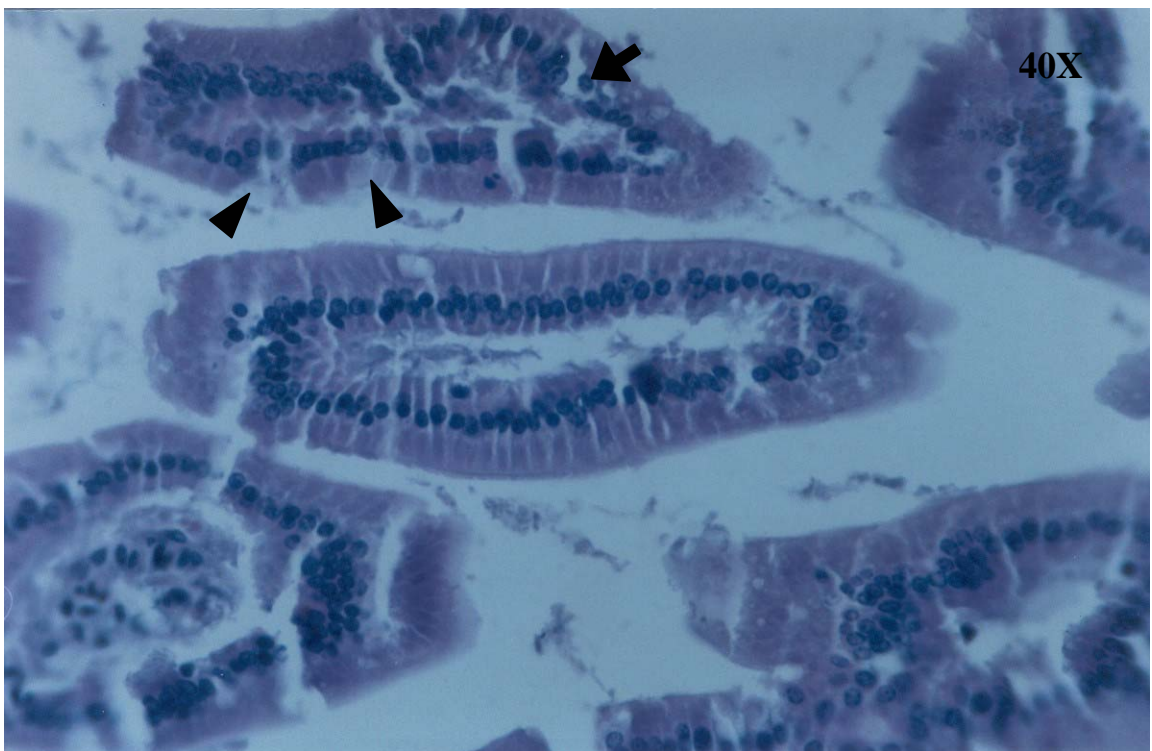


Figura 12: Fotomicroscopia do íleo, aumento de 40x, coloração HE (hematoxilina e eosina) do camundongo “*Mus musculus*” com 20 dias, o epitélio apresentou lesões, observado por pequenos conjuntos de células em degeneração, separados por expansões intervenientes de epitélio de mucosa normal. Setas finas, rompimento do epitélio; seta grossa rompimento do epitélio com invasão da lâmina própria. Seta : linfócito, cabeça de seta: rompimento do epitélio.

6. DISCUSSÃO

A fixação experimental de um inóculo conhecido de uma bactéria viável no intestino delgado de camundongos não é uma tarefa fácil. FRETER *et al.* (1983) descreveram que uma linhagem selvagem de *E. coli* proveniente do intestino humano e a linhagem de *E. coli* K12 atravessaram o intestino de um camundongo, após a inoculação oral sem a ocorrência de multiplicação bacteriana no intestino e sem evidencia de colonização do mesmo.

MUSHIN & DUBOS (1965) relataram que devem ser utilizadas na inoculação de uma infecção experimental em camundongos, uma quantidade superior a 9×10^8 células/ml e também que independe do volume da dose de infecção utilizada. A *E. Coli* O26: K60 proveniente da diarréia infantil se estabeleceu em camundongos com 13 dias idade ou mais jovens. Em contraste, a porcentagem da colonização em camundongos com 18 dias de idade foram relacionadas as doses utilizadas. Os níveis de infecção com relação a patogenicidade foram consideravelmente menores em animais com 24 dias de idade, neste caso, o número de *E. coli* tendeu a decrescer rapidamente no trato gastrintestinal em 48 horas após a infecção. No presente estudo nós utilizamos uma solução contendo 10^8 células/ml como dose de infecção, pois não foi possível utilizar as dosagens preconizadas por outros autores devido a morte de vários animais, o que implicou nos resultados obtidos, resultando em dados diferentes das linhagens que possuem o gene envolvido com a aderência tecidual.

TZIPORI *et al.* (1989), descreveram que as linhagens mais virulentas de EPEC foram aquelas que causaram lesões attaching-effacing (A/E) na porção proximal intestino delgado bem como o restante do trato-gastrointestinal. As lesões de A/E das linhagens de EPEC que foram do intestino grosso e da porção distal do intestino

delgado causaram uma discreta diarreia. Devemos lembrar que as linhagens de *E. coli* isoladas dos bovinos usadas neste trabalho não foram isoladas das fezes diarreicas de gado, mas vieram do leite mastítico e podem expressar um conjunto de genes de aderência tecidual completamente diferente das linhagens de origem diarreica.

CONLAN & PERRY (1998), utilizaram três linhagens de camundongos CD1, BALB/C, C57BL/6, de acordo com a susceptibilidade de sua colonização intestinal por uma cepa patogênica entérica *E. coli* 0157:H7. Os animais foram inoculados via introgástrica e o epitélio intestinal destes se tornaram infectados mediante presença do patógeno nas fezes, 26,5% dos camundongos estudados desenvolveram a doença em resposta à colonização pelo microrganismo. Após a primeira inoculação os camundongos BALB/C pareceram adquirir resistência a recolonização pela mesma *E. coli*, evidenciadas por uma diminuição das mesmas nas fezes. Este aumento na resistência foi correlacionado com a presença e persistência da IgA no soro e nas fezes. As implicações destes achados foram utilizados para o desenvolvimento de uma vacina contra *E. coli* 0157:H7. No nosso estudo apenas uma inoculação foi realizada para cada animal estudado, já que as condições de sobrevivência destes seria limitada, pois o biotério onde os animais ficaram não fornecia as condições ideais necessárias como a temperatura, pois o local não era climatizado e estes viviam estressados e morriam facilmente.

WADOLKWSKI *et al.* (1990), caracterizaram que a *E. coli* 0157:H7 que produz toxinas Shiga e carrega um plasmídeo que codifica uma adesina para as células intestinais (Henle 407), foram capazes de manter um nível de colonização em cerca de dois terços dos camundongos testados a níveis de células epiteliais de intestino grosso e delgado. No nosso estudo a linhagem 3, e a linhagem 5, também apresentaram aderência nas células epiteliais de intestino grosso e delgado de forma difusa, que foi evidenciada através da microscopia de luz (figs. 10, 11 e 12).

CONLAN *et al.* (2001), observaram a habilidade de persistência da *E. coli* 0157:H7 no trato intestinal de camundongo adulto CD1. A aderência da *E. coli* perdurou por um período superior a duas semanas e também não mostrou malignidade,

embora um isolado obtido após este período produziu uma grande quantidade da toxina shiga-like-2 in vitro.

NAKAGAWA *et al.* (2002), em seu trabalho, estudaram uma linhagem de *E. coli* BMES transformada com o gene *stx1* (shiga tipo I). A inoculação da bactéria transformante foi feita por via oral e recuperada via fecal em três semanas. Sinais neurológicos bem como mudanças histopatológicas do intestino e dos rins foram observadas dentro de três dias após a infecção, assim como a elevação de citocinas no soro, enquanto que as linhagens BMES colonizadas não mostraram nenhuma mudança patológica. Neste trabalho realizado, pode-se evidenciar que das cinco cepas inoculadas, somente duas mostram aderência às vilosidades intestinais sugerindo que estas pudessem atuar de forma mais agressiva em função da produção da toxina Shiga.

SHIMIZU *et al.* (2003), utilizaram uma cepa de *E. coli* contendo o gene *stx 2*, o qual foi inoculado em camundongos. Os camundongos foram previamente alimentados com água contendo sulfato de estreptomicina, conduzindo a um aumento da bactéria nas fezes. Análises periódicas mostraram um aumento da concentração de *stx 2* na porção final do intestino, e análises histopatológicas e bioquímicas do sangue revelaram lesões em ambos os rins e órgãos hematopoiéticos, sugerindo assim que a *stx 2* desenvolve uma infecção letal em camundongos. Em nosso estudo os camundongos não foram previamente tratados com medicação antibacteriana, sugerindo assim um novo modelo de estudo, provando que a aderência às vilosidades intestinais não estão diretamente vinculadas apenas ao tratamento prévio e sim a uma série de fatores que conferem patogenicidade.

PATON *et al.* (2001), desenvolveram uma bactéria recombinante *E. coli* (STEC) que expressa um receptor da toxina Shiga que neutraliza a toxina Shiga com eficiência. Neste estudo os pesquisadores investigaram a capacidade protetora do formaldeído em competir pela ligação com o receptor da toxina Shiga da bactéria recombinante com a própria toxina, fazendo assim com que esta toxina não exerça danos que conduzam a seqüelas como o caso da Síndrome hemolítica urêmica, sugerindo um modelo a ser utilizado em humanos.

A histopatologia do A/E foi caracterizada nos patógenos de EPEC e de STEC (KNUTTON, 1996; KAPER *et al.*, 1998), as lesões foram observadas em meio de cultura de células de tecido, em modelos experimentais com animais e também em tecidos provenientes de seres humanos infectados com EPEC (NATARO & KAPER, 1998), mas a presença do A/E, não foi claramente observada nos modelos de infecção em camundongos (WADOLKOWSKI *et al.*, 1990). Uma explicação para este problema poderia ser a competição da *E. coli* endógena da microbiota do camundongo pelos mesmos locais de adesão (FRETER *et al.*, 1983; SHIMIZU *et al.*, 2003), assim sendo, a única maneira de observar a colonização do intestino do camundongo por *E. coli* patogênica seria a utilização prévia de drogas antibacterianas para suprimir a microbiota intestinal endógena (MUSHIN & DUBOS, 1965), mas neste caso a competição entre as bactérias da microbiota do hospedeiro e as bactérias invasoras é eliminada, o que deve mascarar os resultados da colonização. No modelo utilizado neste estudo, foram encontradas mucosas intestinais ligeiramente danificadas por algumas das linhagens da *E. coli* utilizadas, mas os resultados não são conclusivos e mais pesquisas neste modelo de estudo seriam necessárias para melhorar os resultados e a compreensão do comportamento das linhagens de *E. coli* de bovinos no intestino do camundongo.

7-CONCLUSÕES:

Verificamos, apesar de que o camundongo ainda não seja um modelo ideal devido a se obterem melhores resultados quando a Streptomicina foi utilizada previamente à infecção, este ainda é de fácil colonização em seu epitélio intestinal. É mais fácil a reprodutibilidade dos resultados, é mais acessível financeiramente, oferece mais vantagens do que os coelhos por necessitarem de espaços menores, e também é mais rápido o período gestacional, podendo se obterem filhotes em apenas dezenove dias facilitando assim as pesquisas envolvendo este tipo de modelo.

Verificamos ainda que as linhagens de número três e cinco são capazes de se aderirem ao epitélio intestinal provocando alterações nos mesmos, enquanto que outras linhagens não menos patogênicas, não são capazes de se aderirem ao epitélio, talvez porque competem entre si pelo mesmo receptor, ou mesmo por não serem capazes de colonizarem o epitélio devido a uma competição da microbiota endógena com as cepas que foram inoculadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis e enfermidades transmissíveis comunes al hombre y a los animales. Bacterioses y micosis*. Ed: Organization Panamericana de La Salud (OPS). Washington – DC . **Publicacion Científica y Técnica**. . vol.I. ,n° 580 p.398, 2001.

ADAM, M.R. MOSS, M.O. *Microbiologia de los Alimentos*. 1° ed. Zaragoza (Espanha): **Editorial Acribia** p. 463 1997. Traduzido por Manuel Ramis Verges

ANNON. Outbreak of gastrointestinal disease – Ontario. **Journal of Food Protection**, v.50, p. 438-439, 1987.

ANTAI, S.P. ; ANOZIE, S.O. Incidence of infantile diarrhoea due to enteropathogenic *Escherichia coli* in Port Harcourt metropolis. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p. 227- 229, 1987.

BELONGIA, E.A.; OSTERHOLM, M.T.; SOLER, J.T. *et al.* Trasmision of *Escherichia coli* O157:H7 in Minnesota child day – care facilities. **Journal of American Medicine Association**, v.269, p. 883-888, 1993.

BHAN, M.K.; BHANDARI, N.; SAZAWAL, S.; CLEMMENS, J.; RAJ, P.; LEVINE, M.M.; KAPER, J.B. - Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. **Bull WHO**, v.67, p. 281-288, 1989.

BORCZYK, A.A.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; DUNCAN, L.M.C. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, v.1, p. 98, 1987.

BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J. *Microbiologia Alimentaria. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad e Calidad Alimentaria*. 1 ed. V.1. Zaragoza (Espanha). **Acribia**, p. 437, v.1 Zaragoza (Espanha), 1994. Traduzido por Victor A. Diez Fernandes.

BOUZARI, S.; VARGHESE, A. Cytolethal distending toxin (CLDT) production by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, p. 193-198, 1990.

BRENNER, D.J. Family I. *Enterobacteriaceae* RAHN, 1937, *In*: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p. 408-516, 1984.

BRYANT, H.E. ATHAN, M.A. ; PAI, C.H. Risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 infections in an urban community. **Journal of Infectious Disease**. v.160, p. 858-864, 1989.

BUCHANAN, R.L.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food Technology**, v. 51, p. 69-76, 1997.

BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a single means of evaluating the acid tolerance of stationary phase cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4009-4013, 1996.

CALDERWOOD, S.B.; ACHESON, D.W.K.; KEUSCH, G.T.; GRIFFIN, P.M.; STROCKBINE, N.A.; SWAMIMTHAN, 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, 1996.

CANTEY, J. R.; BLAKE, R. K .Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit:a novel mechanism. **Journal of Infectious Disease**,v. 135, n.3, p. 454-62, 1977.

CAPRIOLI, A.; LUZZI, I; ROSMINI, F. Hemolytic uremic syndrome and vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in Italy. The HUS Italian Study Group. **Journal of Infectious Disease**, v.166, p.154-158, 1992.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers – Western United States, 1992 – 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, p. 258-263, 1993.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PRENVENTION. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.44, p. 550-551, 557-558, 1995.

COLAN, J.W.; PERRY,M.B. Susceptibility of three strains of conventional adult mice to intestinal colonization by an isolate of *E. coli* O157:H7. **Canadian Journal of Microbiology**, v .44, p. 800-805, 1998.

CONLAN, J., BARDY,S.,L KUOLEE, R.;WEBB,A.; PERRY,M.,B. Ability of *E. coli* O157:H7 isolates to colonize the intestinal tract of conventional adult CD1 mice is transient. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p .91-95, 2001.

CORREA, M. G. P.; MARIN, J .M. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil,**Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 125-132, 2002.

DONNENBERG, M.S.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.T. Epithelial cell invasion: a over-looked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherent factor. **Journal of Infectious Disease**, v.160, p. 453-459, 1989

DRASAR, B.S. ; HILL, M.J. The distribution of bacterial flora in the intestine. In:DRASAR, B.S.; HILL, M.J. (ed). Human intestinal flora. **Academic Press London**, p. 36-43, 1974.

DUGUID, J.P.; MARMION, B.P.; SWAIN, R.H.A. **Mackie and McCartney Medical Microbiology**. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1978.

EDELMAN, R.; KARMALI, M.A.; FLEMING, P.A. Summary of the International Symposium and Workshop of Infections due to vero-cytotoxin (shiga – like toxin) – producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Disease**, v. 157, p.1102–1104, 1988.

FLETCHER, J.M.; SAUNDERS, J.R.; BATT, R.M.; EMBAYE, H.; GETTY, P.; HART, C.A. Attaching effacement of the rabbit enterocyte brush border is encoded on a single 96,5 Kilobase – pair plasmid in an EPEC O111 strain. **Infection and Immunity**, v. 58, p.1316- 1322, 1990.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. 1996. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo. **Atheneu**, p.182, 1996.

FRETER, R., BRICKNER, H., FEKETE, J., VICKERMAN, M.M., CAREY, K.E. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 686-703, 1983.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Review**, v.13, p. 60-98, 1991.

GUNZER, F.; BOHM, H.; RUSSMANN, H.; BITZAN, M.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Molecular detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157:H7 in patients with hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p.1807-1810, 1992.

HADAD, J. J.; GYLES, C. L. Scanning and Transmission Electron Microscopic Study of the small intestine of colostrum-fed calves infected with selected strains of *Escherichia coli*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n.1, p. 41-49, 1982.

HARRIGAN, W.F. Laboratory methods in food microbiology. 3.ed. Academic Press, p.520
1998.

HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS, W.D.; RIPPEY, S.R. ; CHANDLER, L.A. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual*, p. 401-406 , 1995.

HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A. ; TODD, E.C.D. Coliforms, *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. **American Public Health Association (APHA)** p.1219, 1992.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3ed. Zaragoza: **Editorial Acribia**, p. 803, 1994.

JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; BEZANSON, G.S. Citotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **Lancet**, p.76, 1983

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Editora Guanabara Koogan, 1995

KAPER, J.B., GANSHEROFF, I.J., WACHTEL, M.R., O'BRIEN, A.D. Intimin-mediated adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens. **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. Washington, DC, ASM, p. 148-56, 1998.

PUNYASHTHITI, KANNIKAR.; FINKELSTEIN, RICHARD A. Enteropathogenicity of *Escherichia coli* I. **Evaluation of Mouse Intestinal Loops**. *Infect Immun*, p.473–478, 1971.

KAPER, J.B. *Presentation to Society for General Microbiology*. Durham, 1987.

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

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic – uremic syndrome, haemorrhagic colitis. **Lancet**, v II, p.1299-1300, 1983.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. An association between idiopathic hemolytic – uremic syndrome and infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Disease**, v. 151, p.775-782, 1985.

KNUTTON, S. Attaching and effacing *Escherichia coli*. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford, UK, CAB International, p. 567-91, 1996.

KNUTTON, S.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; McNEISH, A.S. Role of plasmid – encoded virulence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP – 2 cells. **Infective Immunity**, v. 55, p. 78-85, 1987.

KNUTTON, S., BALDWIN, T., WILLIAMS, P.H., McNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1290-8, 1989

KREJANY, E. O.; GRANT, T. H.; WOOD, V. B.; ADAMS, L. M.; BROWNE, R. R.; Contribution of plasmid-encoded fimbriae and intimin to capacity of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli* to attach to and colonize rabbit intestine. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 6472-6477, 2000.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhoea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic e enteroadherent. **Journal of Infectious Disease**, v.155, p. 377-389, 1987.

LEVINE, M.M.; NATARO, I.P.; KARCH, H.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E; CLEMENTS, M.L. ; O'BRIEN, A.D. The diarrhoeal response of humans to some classic serotypes of *Escherichia coli* is dependent on enteroadhesiveness factor. **Journal of Infectious Disease**, v.152, p. 550-559, 1985.

LEVINE, M.M.; XV, J.; KAPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATAN, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA – probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Infectious Disease**, v.156, p.175-182, 1987.

LINDGREN, S. W.; SAMUEL, J. E.; SCHMITT, C. K.; O'BRIEN, A. D. The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. **Infection and Immunity**, v.62, p.623-631, 1994.

LINDGREN, S. W.; MELTON, A. R.; O'BRIEN, A. D. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. **Infection and Immunity**, v.61, p.3832-3842, 1993.

LIOR, H. *Escherichia coli* O157:H7 and verotoxigenic *Escherichia coli* (vtec). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 14, p. 378-382, 1994.

MARKS, S.; ROBERTS, T. *Escherichia coli* O157:H7 ranks as fourth most costly foodborne disease. **Special Reprint from Food Review**, v.16, p. 3, 1993.

MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D.; WELLS, J.G.; POTTER, M.E. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, v.II, p.1043, 1986.

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

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p.179-184, 1994.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington **APHA**, p. 331-341, 2001.

MILIDIS, M.D.; KOORNHOF, H.J.; PHILLIPS, J.I. Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli* in a vitro Henle 407 cell model. **Infection and Immunity**, v.57, p. 1928-1935, 1989.

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

MONTENEGRO, M.A.; BALTE, M.; TRUMPT, T.; ALEKASIC, S. Detection and characterization of fecal verotoxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.1417-1421, 1990.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41,n. 3,1983.

MUSHIN, R., DUBOS, R. Colonization of the mouse intestine with *Escherichia coli*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 122, p. 745-57, 1965.

MUSHIN, R., DUBOS, R. Coliform bacteria in the intestine of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.123, p.657-663, 1965.

NAKAGAWA I, NAKATA M, YAMAMURA T, WAKISAKA S, KAWABATA S, HAMADA S. Infection and pathogenesis of a murine strain of *Escherichia coli* with genetically introduced Shiga toxin type I operon in conventional mice. **Microbial pathogenesis**, v. 33, p. 63-72, 2002.

NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p.142-201, 1998

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

O'BRIEN, A.D.; LA VECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type I – like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Disease**, v.146, p.763-769, 1982

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*. **Methods in Microbiology**.. Cap. 14, p. 43-112, 1984.

OSTROFF, S.M.; TARR, P.I.; NEILL, M.A. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli*, O157:H7 infections. **Journal of Infectious Disease**, v.160, p.994-998, 1989.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**. v. 55, p. 555-565, 1992.

PAI, C.H. AHMED, N.; LIOR, H. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two year prospective study. **Journal of Infectious Disease**, v.157, p.1054-1057, 1988.

PATON JC, ROGERS TJ, MORONA R, PATON AW. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**,v. 69, p.1389-93, 2001.

PEETERS,J. E.; GEEROMS, R.; ORSKOV, F. Biotype, Serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. **Infection and Immunity**.v. 56, p. 1442-48, 1988.

PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **J Infect Dis** v.181, p.1496-1500, 2000.

RILEY, L.W. The epidemiological, clinical and microbiologic features of haemorrhagic colitis. **Annual Review Microbiology**, v.41, p. 383-408, 1987.

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

ROBINS-BROWNE, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhoea. **Reviews of Infectious Disease**, v .9, p. 28-53, 1987

ROBSON, W.L.; LEUNG, A.K.; MONTGOMERY, M.D. Causes of death in hemolytic uremic syndrome. **Child Nephrology Urology**, v.11, p .228-233, 1991.

RYAN, C.A.; TAUXE, R.V.; HOSEK, G.W. *Escherichia coli* O157:H7 in a nursing home: clinical, epidemiologic and pathological findings. **Journal of Infectious Disease**, v.154, p.631-638, 1986.

SACK, R.B. Human diarrhoeal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v.29, p. 333-353, 1975.

SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. **Infection and Immunity**, v. 45, p. 534-536, 1982 .

SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, v.II, p. 885-886, 1985.

SENERVA, D.; OLSVIK, O.; MUTANDA, L.N. Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic *Escherichia coli* and correlation with the clinical history of the children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2539-2543, 1989.

SHIMIZU, K., ASAHARA, T., NOMOTO, K., TANAKA, R., HAMABATA, T., OZAWA, A., TAKEDA, Y. Development of a lethal Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infection mousemodel using multiple mitomycin C treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, p. 1-9, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo. **Varela**, p. 295,1997.

SMALL, P.L.C. ; FALKOW, S. Identification of regions on a 230 – K base plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into Hep – 2 cells. **Infection and Immunity**, v.56, p.225-229, 1988.

SMITH, H.R.; SCOTLAND, R.; WILLSHAW, G.A. Verocytotoxin and presence of VT genes in *Escherichia coli* strains of origin animal. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.829-834, 1988.

SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: The effects of temperature, pH and sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p. 29-49, 1995.

SZABO, R.A.; TOOD, E.C.D.; JEAN, A. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. **Journal of Food Protection**, v.49, n.10, p.768-772, 1986.

TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostics, and epidemiological aspects of human infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 20, p.1-10, 1995.

TZIPORI, S., GIBSON, R., MONTANARO, J. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1142-50, 1989

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C.; WHITTAM. T.S.; GOMES,T.A.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A.G. Traditional and non tradicional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p.1-6, 1996.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE: APHIS: VS. *Escherichia coli* O157:H7 issues and ramifications. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, **Veterinary Services**, Fort Collins, Colorado. 1994.

VANDER WAAIJ, D., BERGHUIS-DE VRIES, J.M., LEKKERKERT, J.E.C. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **Journal of Hygiene**, v. 69, p. 405-511, 1971.

VALLANCE, B.A.; FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 97, p. 8799-8806, 2000.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne pathogens. An illustrated text. **Marison Publishing**, p. 501, 1996.

VIAL, P.; ROBINS – BROWNE, R.; LIOR, H. Characterization of enteroadherent – aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrhoea disease. **Journal of Infectious Disease**, v.158, p. 70-78, 1988.

WADOLKOWSKI, E.A.; BURRIS J. A.; O'BRIEN A. D. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v.58, n 8, p. 2438-45, 1990.

WADOLKOWSKI, E. A.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. Colonization of the Steptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain : role of growth in mucus. **Infection and Immunity**, v.56, p. 1030-1035, 1988.

WALMER–TOUWS, D. VTEC – is it a food-borne zoonosis? **Journal of Food Protection**, v.53, p.258-261, 1990.

WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; JINNEMN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection.**, v. 58, p. 712, 1995.

WILLSHAW, G.A.; THIRLWELL, J.; JONES, A.P.; PARRY, S.; SALMON, R.L.; HICHEY, M. Verocitotoxin – producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhea, haemorrhagic colits and haemolytic uraemic syndrome in Britain. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p. 304-307, 1993.

9-ABSTRACT

The aim of this study was to develop a enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection model in mice. An inoculum of 10^8 CFU of EPEC strains 3111-90 from infantile diarrhea; 537-1, 263, 304-3 and 988-2 from bovine mastitic milk to newborn mice lead to a mild damage in the intestinal mucosa with breaking in the superficial stratum, epithelial cells with irregular shape and a inflammatory cell infiltration.

Keywords: EPEC, mouse model, histopathology lesions.