

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

**FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE
Escherichia coli PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE
ÁGUA, LEITE E FEZES DE BOVINOS LEITEIROS DA
REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO-SP, BRASIL.**

Ariel Eurides Stella
Médico Veterinário

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2009**

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

FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA, LEITE E FEZES DE BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO-SP, BRASIL.

Ariel Eurides Stella

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2009**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ARIEL EURIDES STELLA - nascido a 19 de dezembro de 1978 em Ibiraiaras-RS. Concluiu o Segundo Grau na Escola Técnica Federal de Goiás – Unidade de Jataí em 1996. Iniciou o curso de Medicina Veterinária, no ano de 1997, na Universidade Federal de Goiás, Câmpus de Jataí, concluindo em março de 2002. Em 2002 iniciou o curso de especialização "*Lato-Sensu*" em Produção de Ruminantes, na Universidade Federal de Lavras, concluindo em 11 de dezembro de 2003. Em 2003 foi aprovado em concurso para professor assistente substituto na disciplina de Inspeção e Tecnologia de leite do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Campus de Jataí, onde lecionou na respectiva disciplina durante o ano letivo de 2003. Em fevereiro de 2006, obteve o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP de Jaboticabal. Em fevereiro de 2009 é aprovado em concurso público para a vaga de professor adjunto lotado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Rio Verde.

"Se todo dinheiro do mundo fosse repartido igualmente, em pouco tempo estaria de volta ao bolso de alguns poucos. Porque a verdade é que é difícil receber mais do que se é. Para ter mais amanhã você precisa ser mais do que é hoje ".

Jim Rohn

Dedico,

A Deus, que está acima de todas as coisas,

**A minha mãe que sempre me incentivou a seguir em frente e que
juntamente com as minhas irmãs me ensinou a tornar-me um homem de boas
e sólidas convicções.**

**Ao meu pai, que mesmo na ausência sei que ele esta me abençoando e
torcendo por mim, a sua presença foi curta, mas o seu exemplo de caráter e
dignidade é o meu mais forte incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, não só pela orientação e ensino, mas também pelo imenso apoio e confiança.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia Veterinária, João L. Quintana, pelo auxílio em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Veterinária, Ana Claudia Oliveira e Renato P. Maluta.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Bactérias da FCAV-UNESP.

Ao Professor José Moacir Marin pelo auxílio com as análises moleculares.

Aos meus amigos de pensionato Aline C. Galvão e Matheus V. Parenti.

Aos professores e amigos da UFG-Jataí, em especial, Cássio A. P. Fontana e Vera Lúcia Dias da Silva Fontana.

Aos Professores e amigos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Rio Verde, a dedicação e a amizade de vocês torna o meu trabalho uma tarefa estimulante e prazerosa.

Agradeço também a FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos os professores, colegas de Pós-Graduação e estagiários, especialmente a secretária da Microbiologia Edna M. T. Daquila, pelo incentivo e apoio.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	44
8. REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

⁰C – Graus Celsius

eae – “Attaching and effacing”

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

g – Grama

CH – Colite hemorrágica

SHU – Síndrome hemolítica urêmica

LT – Toxina termo-lábil

O – Antígeno somático

pH – Ponto hidrogeniônico

STEC - *Escherichia coli* shigatoxigênica

TC – Toxina colérica

TSI – Tríplice açúcar e ferro

Vero – Célula de rim de macaco verde africano

VT – Verotoxina

VTEC - *Escherichia coli* verotoxigênica

STX₁ – Gene codificador da toxina shiga-like 1

STX₂ – Gene codificador da toxina shiga-like 2

Hly – Gene codificador para enterohemolisina

EAF – Plasmídeo das EPEC tipo I

BFP – Fator de aderência denominado “Bundle – forming pili”

LEE – Locus of enterocyte effacement

APPCC – Programa de análise de perigo em pontos críticos de controle

LISTA DE TABELAS

Páginas

1. "Primers" utilizados na PCR para amplificar fragmentos específicos dos genes codificadores de fatores de virulência 19
2. Número e percentagem de isolados de *E. coli* oriundos de bovinos da região de Ribeirão Preto que apresentaram os genes stx1, stx2, eae ou LT-II detectados por reação em cadeia de polimerase. Jaboticabal/SP, 2007. 26
3. Número e percentagem de isolados de *E. coli* oriundos de bovinos da região de Ribeirão Preto que apresentaram os genes stx1, stx2, eae ou LT-II detectados por reação em cadeia de polimerase, de acordo com a categoria animal. Jaboticabal/SP, 2007. 26
4. Número e percentagem de isolados de *Escherichia coli* oriundos de água e leite que apresentaram as seqüências stx1, stx2, eae ou LT-II detectadas por reação em cadeia de polimerase. Jaboticabal/SP, 2007.. 26
5. Isolados de *Escherichia coli* que apresentaram seqüências stx1, stx2, eae, hemólise e os sorogrupos/sorotipos.. 27

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene Stx1 e Stx2 de <i>E. coli</i>	22
2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2.	23
3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção dos genes Stx1, Stx2, eae e LT II de <i>E. coli</i>	24
4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene LT-II de <i>E. coli</i>	25
5. Dendograma comparando os produtos da PCR dos isolados totais (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2). A: água, L: leite, F: fezes (sorogrupos O158 e O142). NT: não sorotipadas.	30
6. Dendograma comparando os produtos da PCR dos isolados totais (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2). A: água, L: leite, F: fezes (sorogrupos O55, O114, O26, O125, O126 e O111), NT: não sorotipadas.....	31
7.. Dendograma comparando os produtos da PCR dos isolados (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2). Somente isolados STEC oriundos das fezes dos animais e do leite do tanque de expansão da propriedade número 7.....	32

8. Dendograma comparando os produtos da PCR dos isolados (amostras de DNA amplificado na presença dos primers Stx1, Stx2, LT-II). Somente isolados STEC e ETEC oriundos das fezes dos animais da propriedade número 7.....33

**FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*
PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA, LEITE E FEZES DE BOVINOS
LEITEIROS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO-SP, BRASIL.**

RESUMO – Os objetivos deste estudo foram os de caracterizar, pela técnica de PCR, marcadores de virulência (*Stx1*, *Stx2*, *eae*, LT-II), bem como identificar a presença de atividade hemolítica e do sorotipo O157:H7 de *Escherichia coli* (*E. coli*) isoladas de amostras de água, leite e fezes de bovinos de propriedades leiteiras, da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Também foi objetivo estabelecer relação entre os isolados através da técnica de ERIC-PCR. Seqüências de genes *stx1* apresentaram 11,4% de freqüência nos isolados de fezes dos bovinos, seguidas pelas *stx2* (7,1%), LT-II (6,4%) e *eae* (4,3%). Os bezerros apresentaram uma maior freqüência para todos os genes. A freqüência geral das STEC foi de 17,6 %. Dois sorotipos O157:H7 apresentaram os genes *stx1* ou *stx2* e *eae*; e um deles demonstrou hemólise. Seqüências *stx1*, *stx2* e LT-II foram identificadas em *E. coli* isoladas do leite. Há similaridade genética entre isolados de fezes, leite e água. Os resultados indicam a presença e a mobilidade de potenciais estirpes enterohemorrágicas de *E. coli* em rebanhos leiteiros brasileiros.

Palavras chave: *Escherichia coli*, bovinos leiteiros, STEC, O157:H7, ETEC.

**VIRULENCE FACTORS OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM,
WATER, MILK AND BOVINE FECES IN THE REGION OF RIBEIRÃO PRETO,
SAO PAULO, BRAZIL.**

ABSTRACT- The objectives were to characterize virulence factors (*stx1*, *stx2*, *eae*, *LT-II*) by PCR in *Escherichia coli* isolated from dairy farms in the region of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil and to establish the relationship between isolates by the ERIC-PCR technique. Colonies were identified biochemically as *E. coli* strains. Detection of genes *stx1*, *stx2*, *eae* and *LT-II* in the isolates was by PCR, while ERIC-PCR was utilized for epidemiological characterization. Gene sequences *stx1* were more frequent in bovine feces (11.4%), followed by *stx2*(7.1%), *LT-II* (6.4%) and *eae* (4,3%). All genes were more frequent in calves. Two 0157:H7 serotypes showed genes *stx1* or *stx2* and *eae* and one of them was hemolytic. The general frequency of STEC was of 17,6%. Sequences *stx1*, *stx2* and *LT II* were identified in *E.coli* strains isolated from milk. Isolates from feces, milk and water were genetically similar. Results indicate the presence and mobility of potentially enterohaemorrhagic strains of *E. coli* in Brazilian milk herds.

Keywords: *Escherichia coli*, dairy cattle, STEC, O157:H7, ETEC.

I. INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos, por entero-patógenos, é uma importante causa de diarreia em países em desenvolvimento, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade com perdas econômicas significativas (LEVINE e EDELMAN, 1984; LOPEZ-SAUCEDO, 2003). As doenças veiculadas por alimentos de origem animal exercem um grande impacto em saúde pública.

O gênero *Escherichia*, que contém a maioria dos bacilos móveis Gram negativos da família Enterobacteriaceae (NATARO e KAPER, 1998), compreende as espécies: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*. A *Escherichia coli* é a espécie tipo do gênero (BOPP, 1999).

A *E. coli*, usualmente, permanece sem causar dano, confinada ao lúmen intestinal, entretanto em indivíduos debilitados ou imunossuprimidos, ou ainda quando as barreiras imunes do trato gastrointestinal são violadas, mesmo as espécies não patogênicas podem causar infecções (NATARO e KAPER, 1998).

As *E. coli* podem ser classificadas em grupos, de acordo com as características individuais de patogenicidade: ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica), EHEC (enterohemorrágica), STEC (shigatoxigênica), EIEC (enteroinvasiva), EAEC (enteroagregativa) e DAEC (difusamente aderente) (NATARO e KAPER, 1998). De todas as categorias, a única considerada como zoonose é a EHEC (GRIFFIN e TAUXE, 1991).

Nos últimos anos a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga-like (STEC) tem se destacado como causa de colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) no homem. Essa doença tem sido relacionada ao consumo de diferentes tipos de alimentos, destacando-se os produtos e subprodutos de origem bovina. Outro importante grupo dessa bactéria, identificado como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) pode causar diarreia severa, principalmente em crianças e neonatos em países em desenvolvimento.

Infecções do trato urinário, bacteremia, meningite e doenças diarréicas, são as síndromes clínicas mais comuns, causadas primariamente por um limitado número de *E. coli* patogênicas (BOPP, 1999).

A lesão característica das infecções causadas pelas EPEC é chamada de “attaching and effacing”, ela pode ser observada em biópsias intestinais de pacientes ou animais infectados, podendo ser reproduzida em culturas celulares (JERSE, et al. 1990). Em adição a estirpes EPEC e EHEC, uma variedade de linhagens capazes de provocar lesões “attaching and effacing” têm sido isoladas de bezerros (FISCHER et al. 1994) suínos (ZHU et al. 1994) e cães (DROLET et al. 1994). Estudos realizados em países em desenvolvimento como Brasil (GOMES et al. 1991) e México (CRAVIOTO et al. 1990) têm demonstrado que de 30 a 40% da diarréia infantil pode ser atribuída as EPEC, e a incidência de infecção por EPEC pode exceder a infecção por rotavírus (GOMES et al. 1991). De acordo com o Segundo Simpósio sobre EPEC este grupo inclui estirpes capazes de provocar lesões histológicas tipo “attaching-effacing” e ausência de produção de toxina Shiga-like; linhagens que possuem o plasmídeo EAF são chamadas de EPEC típicas e as que não possuem este plasmídeo são chamadas de EPEC atípicas (KAPER, 1996). O plasmídeo EAF codifica um fator de aderência localizado denominado “Bundle-forming pili” (BFP), bem como possui genes importantes para a expressão normal da intimina (NATARO e KAPER, 1998).

Infecções causadas por linhagens EPEC têm sido relatadas principalmente em crianças de até dois anos de idade, entretanto surtos graves de diarréia em adultos também têm sido relatados (HEDBERG et al. 1997). Como nas outras *E. coli* causadoras de diarréia, a transmissão das EPEC é pela via oral-fecal, através de mãos contaminadas, alimentos originalmente contaminados, manipulação inadequada e fômites (LEVINE e EDELMAN, 1984).

Toxinas Shiga são conhecidas como verotoxinas, verocitotoxinas ou Shiga-like toxinas, são produzidas por alguns patógenos entéricos como a *Shigella dysenteriae* as STEC e as EHEC. A toxina Shiga contribui substancialmente para o desenvolvimento da CH e é o agente primário causador de complicações como a SUH (O’LOUGHLIN e ROBINS-BROWNE, 2001). A produção de toxina Shiga-like é mediada por fagos lisogênicos os quais codificam a produção de Toxina Shiga 1 (STx1) e

Toxina Shiga 2 (STx2), esses fagos representam potenciais elementos genéticos móveis que podem aumentar o possível número de cepas toxigênicas (LIOR, 1994).

Embora a toxina shiga seja o principal fator de virulência das STEC, a habilidade para produzir intimina (codificada pelo gene cromossomal *eae*) e a posse do plasmídeo codificador de enterohemolisina (*hlyA*) são potenciais fatores de virulência no desenvolvimento de doenças graves (ARMSTRONG, 1996). Muitos pacientes infectados com STEC exibem inicialmente uma diarreia aquosa, que em alguns casos, evolui dentro de um ou dois dias para uma diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica (PATON e PATON, 1998). Os genes envolvidos na patogenia das EHEC são similares aos das EPEC, exceto pela presença de genes cromossomais codificadores para toxina Shiga-like e a presença do plasmídeo 60-MDa característico das EHEC no lugar do plasmídeo EAF das EPEC. O plasmídeo das EHEC é conhecido por codificar enterohemolisina, bem como antígenos fimbriais potencialmente envolvidos na colonização (NATARO e KAPER, 1998).

A EHEC é um subgrupo das STEC que inclui conotações clínicas que não estão implicadas com as STEC, visto que nem todas as cepas STEC são patogênicas, mas todas as EHEC são consideradas patogênicas (NATARO e KAPER, 1998). EHEC podem ser transmitidas por água e alimentos contaminados, entretanto a transmissão direta de pessoa à pessoa também é possível. Na maioria dos casos a transmissão é devido a ingestão de carne bovina contaminada. Nos EUA, a ingestão de hamburgers mal cozidos preparados em casa ou em restaurantes têm sido importante causa de surtos de CH e SHU (GRIFFIN, 1995; GRIFFIN & TAUXE, 1991). Entretanto cepas produtoras de toxina Shiga-like, também foram envolvidas em infecções causadas pelo consumo de produtos lácteos, como queijo (DESCHÊNES et al., 1996) e leite cru (WILSON et al., 1996).

A morbidade e mortalidade associadas aos vários surtos de doenças gastrointestinais causados por STEC têm alertado sobre a importância desses microrganismos à saúde pública (PATON e PATON, 1998).

E. coli é um importante patógeno de bovinos jovens, podendo causar infecções intestinais e até extraintestinais. Linhagens de *E. coli* podem produzir outras toxinas, dentre elas a enterotoxina termolábil (LT) e a enterotoxina termoestável (ST) (GAY e BESSER, 1994). A infecção produzida pela *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) resulta em

diarréia devido a ação de uma ou mais enterotoxinas, e pode causar severa desidratação e levar a morte. As ETEC podem produzir toxinas termolábeis (LT-I e LT-II) e toxinas termoestáveis (STa e STb) (BUTLER e CLARKE, 1994).

Devido aos possíveis perigos acarretados, a saúde pública, por linhagens STEC e ETEC, são necessários estudos que evidenciem a distribuição e frequências destas nos animais e propriedades produtoras de alimentos de origem animal.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* (EPEC) provocam diarreia em todas as espécies animais, incluindo os seres humanos. Mas não produzem nenhuma toxina associada à diarreia, entretanto provocam uma lesão característica no trato intestinal que é descrita como lesão de fixação e esfacelamento, ou seja ocorre a destruição das microvilosidades das células intestinais (HIRSH, 2003).

A síndrome é caracterizada por diarreia líquida, vômito e febre em crianças e neonatos. O aspecto clínico da doença varia de uma diarreia limitada a uma forte síndrome de enterite crônica (NATARO e LEVINE, 1994). Há algum tempo atrás a identificação da EPEC era feita como base somente em relação ao antígeno O, posteriormente esta classificação foi melhorada utilizando-se os antígenos O e H. Em seguida, começou-se a utilizar duas características para se definir uma linhagem como EPEC: capacidade de promover a lesão “attaching-effacing” e ausência de produção de toxina shiga-like (NATARO e KAPER, 1998). As linhagens EPEC possuem no cromossomo uma ilha de patogenicidade chamada de “locus of enterocyte effacement (LEE)” a qual contém os genes necessários a produção da lesão “attaching-effacing” (McDANIEL e KAPER, 1997). As EPEC aderem às células epiteliais como microcolônias localizadas e causam lesões de aderência destrutivas, provocando uma diarreia com abundante quantidade de muco, mas com pouco sangue.

A maior parte, dos primeiros relatos de EPEC, foram associados com surtos de diarreia em neonatos no Reino Unido e EUA. Em países em desenvolvimento é uma das principais causas de diarreia infantil (NATARO e KAPER, 1998). Entretanto, ainda não está claro, o porque das infecções naturais de EPEC serem restritas a crianças de até dois anos (NATARO e LEVINE, 1994). No Brasil, a *E. coli* enteropatogênica, é um dos principais microrganismos responsável por quadros de diarreia em crianças de até 1(um) ano de idade (GOMES et al., 1991; SCALETSKY et al., 2001). FITZHENRY et al. (2002) relatam que de 30% a 40% dos casos de diarreia no primeiro ano de idade é causada por EPEC. As EPEC possuem um plasmídeo que codifica um fator de aderência a mucosa intestinal onde ocorre a destruição das microvilosidades ou o aumento do sitio de aderência para as bactérias (COCOLIN et al. 2000).

As EPEC além de promover a ligação específica à mucosa das células epiteliais destruindo as microvilosidades, podem também expressar um fator de aderência localizado denominado “Bundle-forming pili” (BFP) (KAPER, et al., 1995). Sendo assim as EPEC são divididas em duas categorias: tipo I, que possuem além do gene *eae* o plasmídeo EAF, e o tipo II, que possuem somente o gene *eae* (ANSARUZZAMAN, 2000).

Inicialmente a EPEC fixa-se à célula epitelial do intestino delgado através de um pilus formador de feixe (*BfpA*). Essa ligação desencadeia eventos de transdução de sinais, envolvendo a fosforilação de uma proteína principal da célula epitelial Hp-90; ativação da fosforilase C; aumentos do inositol trifosfato (IP₃) e do cálcio, e danos as microvilosidades. No terceiro estágio, a intimina coordena a estreita aderência do microrganismo, e uma proteína de 39 kDa produz polimerização da actina e de outras proteínas citoesqueléticas do hospedeiro, bem como rearranjos da estrutura do citoesqueleto. Esse conjunto forma o pedestal característico da EPEC com o microrganismo intimamente aderente (lesão por fixação e esfacelamento ou “attaching-effacing”) (KENSCH e ACHECON, 2002).

As EPEC, portanto podem causar sérios surtos de infecção diarreica, principalmente em crianças (PRÈRE et al., 2006), uma vez que já foram isoladas de alimentos e produtos lácteos (LEVINE, 1987; SILVA, 2001). Evidenciando ainda mais o perigo à saúde pública, CARNEIRO et al. (2006) demonstraram, que o leite pasteurizado no Brasil, pode ser um potencial veículo de transmissão de EPEC.

Uma grande variedade de sorotipos de *E. coli* produtoras de toxina shiga-like(STEC) podem implicar em doença em humanos, entretanto alguns sorotipos encontrados em gado ou em alimentos, raramente estão associados com doenças severas em humanos. Estas aparentes diferenças, freqüentes nos sorotipos de STEC isoladas, podem ser devido a questões de metodologia e também na habilidade de certas linhagens para causar doença (BOERLIN, 1999). Entretanto, TRISTÃO et al. (2007) sugerem que bovinos sadios podem ser potenciais fontes de infecção, por STEC, para humanos no Brasil. BETTELHEIM et al. (2005) sugerem que populações comensais de *E. coli* eliminadas nas fezes dos bovinos representam um reservatório heterogêneo de sorotipos, dos quais alguns podem adquirir verocitotoxigenicidade tornando-se potenciais patógenos para o homem. BIELASZEWSKA et al. (2000)

também sugerem, que os bovinos podem ser reservatório de STEC e fonte para a doença em humanos.

O consumo, de carne ou leite cru, têm sido confirmado, como fontes mais prováveis de infecção em diversos surtos os quais têm ocorrido principalmente no Canadá, USA e no Reino Unido (BLANCO et al., 1996). PATON et al. (1996) relataram um surto de SUH causado pelo consumo de salsicha em conserva contaminada com STEC na Austrália. ALLERBERGER et al. (2001) demonstraram um caso de SHU em uma criança através do consumo de leite cru contaminado com *E. coli* do sorogrupo O157, onde o isolado do paciente e dos animais produtores do leite, eram idênticos. GOVARIS et al. (2002) em seu estudo sugere que a *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em produtos lácteos, e que medidas de controle na fabricação destes produtos são fundamentais para diminuir o risco de contaminação.

A síndrome clínica provocada pelas STEC é caracterizada por intensas cólicas abdominais e diarreia abundante, inicialmente aquosa, mas que rapidamente evolui para sanguinolenta, com presença de coágulos, sem leucócitos nas fezes e manifestando-se em pacientes sem febre durando em média oito dias (RILEY et al. 1983). Alguns pacientes com SHU podem apresentar sintomas neurológicos como letargia, fortes dores de cabeça, convulsões e encefalopatia (TESH e O'BRIAN, 1991).

STEC patogênicas ao homem podem pertencer a diversos sorogrupos, entretanto O157, O111, O113 e O26 são os mais comumente envolvidos (HUSSEIN e SAKUMA, 2005; KARMALI, 1989; PATON & PATON, 1999). No Brasil, VAZ et al. (2004) identificaram linhagens STEC isoladas de pacientes com diarreia.

As STEC isoladas de animais saudáveis constituem um grupo muito heterogêneo de *E. coli*, e um grande número dessas linhagens parecem ser específicas de seus hospedeiros (BEUTIN, 1995). Os hospedeiros naturais das STEC são animais silvestres e domésticos principalmente os bovinos (GRIFFIN e TAUXE, 1991). As *E. coli* produtoras de toxina shiga-like podem estar presente na flora fecal de uma grande variedade de animais incluindo além dos bovinos os ovinos, caprinos, suínos, felinos, cães e galinhas (BEUTIN, 1993). Entretanto a espécie animal mais importante em relação à infecção em humanos é a bovina. As taxas de colonização das STEC em rebanhos bovinos, é variada, podendo chegar a 60%, mas as taxas típicas variam de 10 a 25%. As STEC são isoladas usualmente de animais sadios (TRISTÃO et al., 2007),

mas podem ser associadas com episódios iniciais de diarreia em animais jovens (ORDEN et al., 1998) seguida por colonização assintomática (NATARO e KAPER, 1998). WANI et al. (2005) relataram um surto de diarreia em bezerros associado a STEC. WIELER et al. (1998) afirmam que STEC causam diarreia em bezerros, e que esta habilidade esta mais associada a cepas que produzem somente Stx₁.

WILSON et al. (1998) demonstraram que animais jovens têm uma prevalência de colonização maior que animais adultos, e bezerros maiores de dois meses têm uma prevalência maior que bezerros com menos de dois meses. SALVADORI et al. (2003) relatam que os bovinos jovens no Brasil, podem ser, uma importante fonte de *E. coli* patogênica a outros animais e ao homem. Investigações em diferentes regiões da Europa, Ásia e América do Norte têm revelado que de 10% a 80% dos bovinos albergam STEC (WELLS, et al., 1991; BEUTIN, et al., 1993). STEC têm sido associada a doenças em humanos em muitos países do Hemisfério Sul, como a África do Sul, Austrália, Chile e Argentina (NATARO e KAPER, 1998).

As STEC, são um importante grupo de patógenos de origem alimentar, que podem causar severa doença gastrointestinal em humanos como a colite hemorrágica (CH) e complicações de modo a levar à síndrome hemolítica urêmica (SHU). O padrão de produção de toxinas, nas STEC isoladas de infecções humanas, parece ser similar ao das STEC isoladas de bovinos saudáveis, mas não similar ao dos bezerros com diarreia (OSEK, 2000). A patogenicidade das STEC esta associada a sua capacidade de produzir toxina Shiga-like e aderir à mucosa intestinal (BARRETT, et al. 1992).

As STEC são definidas pela produção de um ou mais tipos de toxina shiga-like (Stx₁, Stx₂ ou variantes de Stx₂), estas toxinas são antigenicamente relacionadas com a citotoxina (toxina shiga) produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1 (AGBODAZE, 1999). As Shiga-like toxinas são codificadas por bacteriófagos lisogênicos, elementos genéticos móveis, os quais, possivelmente não seriam retidos se não trouxessem vantagem seletiva (WALDOR, 1998).

Outros genes de virulência associados com a produção de doença em humanos são o gene eae, o qual codifica a intimina requerida para o ataque a mucosa intestinal produzindo uma lesão do tipo “attaching and effacing” que indica um íntimo ataque ao enterócito com desaparecimento das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal, e o gene hlyA o qual codifica a hemolisina e esta localizado no plasmídeo 60

MDa das EHEC. O provável papel da hemolisina na patogenese da Colite Hemorrágica e da Síndrome Urêmica Hemolítica ainda é incerto (LEOMIL, 2003). Especula-se que a hemoglobina liberada pela ação da hemolisina seria uma fonte de ferro que talvez estimula-se o crescimento das STEC no intestino (LAW e KELLY, 1995). OSTROFF et al. (1989) relatam que linhagens STEC que produzem somente STx₂ estão mais comumente associadas a doenças graves em humanos, que aquelas que produzem somente STx₁ ou STx₁ e STx₂. Talvez devido ao fato de que o nível de transcrição do gene *stx*₂ in vivo, é maior que o do *stx*₁ (WEINSTEIN, HOLMES e O'BRIEN, 1988). Estudos epidemiológicos têm revelado que, independentemente do sorogrupo, é a presença dos genes que codificam para a toxina Shiga-like 2 (*stx*₂) e intimina (*eae*) que esta associada a doença severa (WERBER, et al., 2003).

A toxina Shiga-like afeta as células endoteliais, resultando em lesão e perda de integridade, o efeito pode ser local (na célula endotelial localizada abaixo da célula à qual a bactéria esta fixada) ou sistêmico (em células endoteliais localizadas em outros locais do organismo) (HIRSH, 2003). A susceptibilidade celular a toxina Shiga-like é determinada pela presença de receptores para a toxina na superfície da célula. Em humanos esses receptores estão presentes principalmente nas células epiteliais do intestino, nas células do endotélio vascular e nas células do epitélio renal (O'BRIEN e HOLMES, 1987). STAMM et al. (2002) relatam que a expressão de receptores funcionais, em bovinos mas não em humanos, para a toxina Shiga-like nos linfócitos, explica as diferenças na patogenia da infecção, ou seja elucida o porque da infecção persistente nos bovinos e o desenvolvimento da doença em humanos.

Desde que as STEC surgiram como patógenos humanos emergentes, a contaminação de alimentos direta ou indiretamente pelas fezes de origem animal, têm sido a maior fonte desses microrganismos (BETTELHEIM, et al., 2005). Em muitos casos, infecções por STEC foram atribuídas, ao consumo de carne bovina, ou produtos lácteos, que foram contaminados com fezes de bovinos. Deste modo o gado leiteiro é considerado reservatório das STEC e pode significar importante risco a saúde do homem (HUSSEIN e SAKUMA, 2005). Dos 193 sorotipos STEC isolados de gado leiteiro até o presente momento, 24 já foram isolados de pacientes com SHU (HUSSEIN e SAKUMA, 2005).

Relatos indicam a associação entre o consumo de leite não pasteurizado e a colite hemorrágica (CH) ou a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (KIRK et al, 1997). A *E. coli* produtora de toxina shiga-like foi também isolada de leite cru, filtros de leite e produtos lácteos como iogurte e queijos (HUSSEIN e SAKUMA, 2005). Bovinos, particularmente bovinos leiteiros são um importante reservatório de STEC (WILSON et al., 1996). A habilidade das STEC em invadir células epiteliais da glândula mamária dos bovinos, pode ser um mecanismo importante na sua patogênese, indicando uma rota pela qual, o leite cru, pode potencialmente se contaminar, fornecendo um reservatório de bactérias para a contaminação de trabalhadores, equipamentos e carcaças em frigoríficos (MATTHEWS et al. 1997). No Brasil, LIRA et al. (2004) relataram o isolamento de STEC de amostras de leite de bovinos com mastite. Rebanhos leiteiros podem contribuir de vários modos à infecção humana pelas STEC. Infecção a partir do consumo de leite cru (CHAPMAN et al., 1993) e produtos lácteos (DESCHENES et al., 1996) já foi demonstrada. Também há relatos de infecção através de contato direto com os bovinos leiteiros (RICE et al., 1996) e com o ambiente da fazenda leiteira (JACKSON et al., 1998).

Alguns fatores contribuem para a presença e disseminação das STEC em um rebanho: práticas de manejo, stress, dieta, densidade populacional, região geográfica e sazonalidade (GARBER et al. 1995). O padrão sazonal com picos no verão contribui para a variação semelhante existente na doença humana associada ao agente (OSTROFF, KOBAYASHI e LEWIS, 1989). Além dos bovinos outros animais domésticos como ovinos, suínos, caprinos, cães e gatos podem albergar STEC (KARMALI, 1989; BEUTIN et al. 1993).

A morbidade e mortalidade associadas com recentes, severos e grandes surtos de doenças causadas pelas STEC, têm realçado a ameaça destes organismos a saúde pública (PATON, 1996). GRIFFIN e TAUXE (1991) relatam que a alta patogenicidade destes microrganismos é uma evidência epidemiológica de que apenas algumas células são suficientes para causar a doença em humanos.

A colite hemorrágica (CH) é caracterizada por intensas cólicas abdominais e diarreia que inicialmente é aquosa, mas que rapidamente evolui para sanguinolenta, com a presença de coágulos. Ocasionalmente o vômito pode ocorrer, enquanto que a febre é baixa ou ausente (PRATA, 1999).

Algumas EPEC são lisogenizadas com os bacteriófagos que codificam a Shiga-like toxina 1 e/ou a Shiga-like toxina 2, essas linhagens são denominadas *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) porque, além da produção de lesões de fixação e esfacelamento, também produzem diarreia hemorrágica (HIRSH, 2003).

A relevância clínico-epidemiológica do quadro diarréico (colite hemorrágica) originado por cepas EHEC se constitui na sua capacidade de produzir a síndrome hemolítica urêmica (SHU) em 2 a 7% dos pacientes. Esta enfermidade pode afetar crianças menores de cinco anos e lactantes com uma letalidade que pode chegar a 10% e com 30% de seqüelas graves tais como insuficiência renal crônica e hipertensão arterial (GRIFFIN e TAUXE, 1991). Nos idosos a SHU, somada a outros sintomas como febre, sintomas neurológicos e púrpura trombocitopênica, podem ocorrer, resultando em mortalidade superior a 50% (PRATA, 1999). A maioria dos surtos e casos esporádicos de CH e SHU, têm sido causados por estirpes de poucos sorogrupos, como O26, O111 e O157 (WELLS et al., 1991).

O reconhecimento da EHEC como uma classe distinta de *E. coli* patogênica, foi definido após dois surtos. O primeiro foi relatado por RILEY et al. (1983), onde nos EUA, foi investigada infecção associada com diarreia sanguinolenta, tendo como agente transmissor da O157:H7 hamburgers mal cozidos, servidos em restaurante do tipo “fast food”. O segundo surto foi relatado por KARMALI et al. (1983) onde foi isolado o sorotipo O157:H7 de crianças com SHU em Toronto no Canadá, quando também foi observada a letalidade das shigatoxinas ou verotoxinas para culturas de células Vero (células de rins do macaco verde africano). Todas as EHEC produzem os fatores citotóxicos para as células Vero e causam colite hemorrágica (DOYLE, 1997).

Os aspectos mais salientes da epidemiologia das EHEC incluem o reservatório no trato intestinal dos bovinos e outros animais, a transmissão que pode ocorrer por uma ampla gama de alimentos, sendo a carne bovina o principal veículo disseminador e a necessidade de pequena quantidade de microrganismos para causar infecção, capacitando graves surtos (NATARO e KAPER, 1998).

Estima-se que, nos EUA, amostras de EHEC causem pelo menos 10.000 a 20.000 infecções por ano e cerca de 200 a 500 mortes (BROTMAN et al. 1995), essas mortes ocorrem mais comumente em crianças e jovens, e são hoje, a causa mais

frequente de insuficiência renal aguda em crianças nos EUA (KENSCH e ACHECON, 2002).

Três propriedades de virulência tem sido reconhecidas nas EHEC: produção de toxina Shiga-like 1 e 2, posse de um plasmídeo de 60 MDa envolvido na expressão de fímbrias raras, e do gene *eae* requerido para a produção de lesão “attaching and effacing” (YU e KAPER, 1992). E também, SPERANDIO et al. (2001), em seu trabalho, indica que o “Quorum Sensing” é um mecanismo de regulação global para as funções fisiológicas básicas das *E. coli*, assim como para os fatores de virulência.

Depois de passar pelo estômago, a EHEC coloniza as porções terminais do intestino, onde permanece confinada à superfície da mucosa e multiplica-se localmente. Não invade a circulação sangüínea. A EHEC possui um homólogo do complexo de genes *eae* da EPEC que coordena o mesmo rearranjo da actina e dos elementos citoesqueléticos que conduzem a uma lesão de aderência e obliteração (attaching/effacing), características nas microvilosidades. A produção de toxinas Shiga-like pode ser responsável por uma resposta local de citocinas na mucosa. Acredita-se hoje que o sangramento abundante seja causado pela interação de citocinas inflamatórias e toxinas semelhantes à toxina Shiga-like, que danificam os vasos sangüíneos na lâmina própria (KENSCH e ACHECON, 2002).

O consumo de leite cru nos EUA resultou em casos de SHU em vários estados: Wisconsin (MARTIN et al., 1986); Washington state (WELLS et al., 1991); Oregon (KEENE et al., 1997). Em outros países como Finlândia (LAHTI et al., 2002) e Canadá (BORCZYK et al., 1987) o consumo de leite cru também causou doença em humanos.

Vários surtos e casos esporádicos de doença em humanos causada pela *E. coli* O157:H7 (O157:H7, O157: H [não móvel] e outros isolados não sorotipados para o antígeno H) oriundos de fazenda leiteiras, enfatizam o papel do leite cru como um importante veículo de transmissão (REITSMA e HENNING, 1996).

E. coli shigatoxigênica pode também se disseminar do ambiente da fazenda leiteira e infectar o homem pelo contato com os animais (CRUMP et al., 2002). As STEC tiveram altas taxas de prevalência em fazendas leiteiras americanas, e também ampla distribuição no ambiente das propriedades (ZHAO et al., 1995). Além disso, o ambiente contaminado de fazendas leiteiras pode persistir como fonte de infecção por STEC por vários meses (HUSSEIN e SAKUMA, 2005). *E. coli* é amplamente carregada

por mamíferos e aves, pode ser detectada na água de consumo e de recreação contaminadas por material fecal, eliminado por humanos, animais domésticos ou silvestres (LEUNG et al. 2004).

A contaminação da água pode ocorrer de diversas formas; a água pode estar contaminada na fonte, a bactéria pode ser introduzida a partir de fezes de bovinos ou animais silvestres (pássaros), ou a contaminação também pode ocorrer através de poeira contendo a bactéria (SARGEANT et al., 2003). A infecção cruzada de gado por água de consumo, já foi bem documentada (SHERE et al., 1998). WELLS et al., (1991) demonstraram uma grande extensão de sorotipos STEC, em gado leiteiro, em diferentes estágios de produção.

Geralmente, os bovinos não são apresentados como portadores de longa duração das STEC, e a eliminação pelas fezes, não têm sido associada com nenhuma doença bovina (GARBER et al., 1995). CRAY e MOON (1995) demonstraram que bovinos experimentalmente infectados com *E. coli* O157:H7 usualmente permanecem sadios e que há uma grande variação de magnitude e duração na eliminação do microrganismo por animais de diferentes idades, com o grupo dos bezerros eliminando o agente em maior quantidade e por um período de tempo mais extenso que os animais adultos. Entretanto, animais de ambos os grupos eliminaram o agente por meses.

WILSON et al. (1996), descreveram o isolamento de STEC do sorogrupo O157 e de outros sorogrupos (O26) em amostras de fezes de bovinos e de humanos residentes em fazendas leiteiras. Segundo o autor, as cepas isoladas de ambas as fontes eram similares, reforçando a hipótese de transmissão e colonização de cepas STEC dos bovinos para o homem. BOERLIN et al. (1999), sugerem que as STEC isoladas de humanos formam uma população diferente daquelas baseadas em reservatórios bovinos ou que são somente uma sub-população deste último.

HORNITZKY et al. (2002), sugerem que as STEC representam uma população dinâmica de sorotipos variantes que pode ser influenciada através da dieta, estresse, níveis hormonais e desenvolvimento anatômico do trato gastrointestinal.

É evidente que as STEC são altamente patogênicas e que a virulência não depende de um único gene ou de um único produto de um gene, mas é um processo multifatorial (LAW, 2000). O conceito de patogenicidade das cepas de *E. coli* está

relacionado com o impacto cumulativo de um ou vários fatores de virulência, o qual serve para diferenciar cepas patogênicas de não patogênicas (JOHNSON, 1991).

Muitos autores têm relatado a importância da colibacilose no Brasil (LEOMIL et al., 2003; SALVADORI et al., 2003). ETEC, são a maior causa da diarreia dos viajantes em regiões subtropicais, bem como nos animais. Estirpes ETEC podem causar diarreia através da produção de LT, ST ou ambas (DEAN et al., 1972; EVANS et al., 1973). As ETEC têm sido relatadas como o principal agente bacteriano causador de diarreia em suínos e bezerros (KIERS *et al.*, 2002).

A enterotoxina LT é uma molécula protéica de alto peso molecular, imunogênica, formada por duas subunidades denominadas de A e B. A subunidade A representa o componente ativo, enquanto a subunidade B é responsável pela fixação da toxina na membrana das células da mucosa do hospedeiro (SUSSMAN, 1985). O mecanismo de ação da toxina LT é idêntico ao da toxina colérica, não ocorrendo um dano estrutural em nível celular, mas sim o bloqueio de suas funções (SPEIRS, 1977; KENSCH, 2002). A LT-I é codificada por plasmídeo e neutralizada por anticorpos antitoxina colérica, ao passo que a LT-II não. A LT-I foi isolada de *E. coli* que acometia humanos e suínos, já a LT-II foi isolada de bovinos, búfalos, humanos e alimentos (HIRISH, 2003). A produção de LT-I não ocorre em estirpes bovinas (Blanco et al., 1993). HIRISH (2003) relata que estirpes que produzem somente ST são as mais comuns, seguidas por aquelas que secretam tanto ST como LT e depois por aquelas que secretam somente LT. Os genes que codificam para a síntese de LT-II já foram clonados e seqüenciados (PICKETT *et al.*, 1989).

ETEC adere e coloniza o intestino com subsequente liberação de enterotoxinas, os genes responsáveis pela produção dessas toxinas são encontrados em plasmídios transferíveis (KARAOLIS e BOEDEKER, 1997). Entretanto, de acordo com PICKETT *et al.* (1989) o gene que codifica LT-II é cromossomal. As ETEC têm sido relatadas como o principal agente bacteriano causador de diarreia em suínos e bezerros (ACRES, 1985; JOHNSON et al., 1992). Todavia, NATARO e KAPER (1998) sustentam que não existem evidências que a LT-II possa estar associada a doença humana ou animal.

A descoberta de que genomas procariotos contêm seqüências repetitivas como a ERIC ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus") (HULTON et al., 1991), tem

expandido o uso da biologia molecular útil para avaliar a variabilidade genética de vários isolados bacterianos, inclusive *E. coli* (VERSALOVIC et al., 1991; CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001). A ERIC são seqüências de palíndromos imperfeitos de 127 pb que ocorrem em múltiplas cópias no genoma das bactérias entéricas e víbrios (WILSON et al., 2006). ERIC-PCR, têm sido utilizada em muitos estudos de diversidade genética em *E. coli* (LIPMAN et al., 1995; JEONG et al. 2005; RAMCHANDANI et al., 2005).

A ERIC-PCR possui uma boa capacidade discriminatória e pode substituir o RAPD-PCR ou RFLP, os quais são requeridos para demonstrar pequenos níveis de variabilidade genética (MAURER et al., 1998). LIPMAN et al. (1995) citam ainda que a genotipagem pelo método de ERIC-PCR é mais prático simples e rápido. A técnica de ERIC é baseada na análise se seqüências cromossomais repetidas, que tem sido usada para a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e para o estudo da relação genética entre isolados (COSTA et al., 2006).

III. OBJETIVOS

1. Caracterizar a frequência da presença dos fatores de virulência (Stx 1, Stx 2, EAE, LT-II) e atividade hemolítica de 473 isolados de *E. coli* oriundas de 19 amostras de água, sete amostras de leite de conjunto e 466 amostras de fezes de bovinos leiteiros de sete propriedades, da região de Ribeirão Preto-SP, através da detecção da presença dos genes pela técnica de PCR.
2. Determinar a frequência dos fatores de virulência por categoria e nas amostras de leite e água;
3. Estabelecer relação de similaridade entre os isolados das amostras de água, leite e fezes, baseado na análise de DNA cromossomal pela técnica de ERIC-PCR.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Identificação das *Escherichia coli*

Os 473 isolados de *E. coli* utilizados nesta pesquisa foram obtidos a partir de amostras de água (19), leite (7) e fezes (466) de animais sadios de sete propriedades leiteiras da região de Ribeirão Preto-SP. Esses isolados foram obtidos através de semeadura dos espécimes em agar MacConkey e agar MacConkey Sorbitol. As colônias crescidas nestes meios, após incubação por 24-48 horas a temperatura de 37° C, foram identificadas bioquimicamente como pertencentes à espécie *E. coli* com base nos testes de fermentação da lactose, produção de indol, reações de vermelho de metila e Voges-Proskawer, utilização de citrato, produção de urease e produção de gás sulfídrico (H₂S) (KONEMAN, 2001). Todas as linhagens de *E. coli* foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro para sorogrupos EPEC da Probac* (Probac do Brasil, SP, Brasil) segundo as instruções do fabricante. As amostras que se mostraram sorbitol negativo no meio agar MacConkey sorbitol foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro específico O157 (Probac). As amostras positivas neste teste foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP para confirmação do sorogrupo e determinação do antígeno flagelar H7.

A presença de enterohemolisina foi determinada de acordo com BEUTIN et al. (1997). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, a verificação da hemólise foi realizada depois de 3 e 24 horas.

Extração de DNA bacteriano

O DNA microbiano, de todos os isolados, foi extraído segundo a técnica proposta por KESKIMAKI et al. (2001), onde a colônia isolada de *E. coli* foi semeada por 12 horas em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio Brain Heart Infusion, depois transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 14.000 rpm para a sedimentação das células e descarte do sobrenadante. As células sedimentadas foram ressuspensas

em 250µL de água MilliQ estéril e agitada em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente sedimentada e repetido o processo de lavagem. Após duas lavagens com água ultra-pura, o tubo eppendorf contendo as células bacterianas foi colocado por 10 minutos na água fervente (100° C). Após esse tempo, os sedimentos dos debris celulares foram sedimentados através de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos, do tubo foi retirado uma alíquota de 150µL do sobrenadante fervido e transferida para outro tubo eppendorf. Em seguida esse material foi estocado em freezer a -20° C até o momento de uso.

Deteção dos genes Stx1, Stx2, eae e LT-II através da técnica de PCR.

O DNA extraído de todas as amostras foi submetido a técnica de PCR utilizando as seqüências de bases dos oligonucleotídios (iniciadores/primers) específicos que estão relacionados na tabela 1. Esses oligonucleotídeos foram adquiridos da Isogen Bioscience. A amplificação do DNA bacteriano foi executado de acordo com o especificado pelo autor para a amplificação dos primers descritos. O produto da reação amplificado foi visualizado em gel de eletroforese contendo 10 µL do produto de PCR e 1,5% de gel de agarose. Foi utilizado o marcador molecular ΦX-174 Hae III digest.

Tabela 1. "Primers" utilizados no PCR para amplificar fragmentos específicos dos genes codificadores de fatores de virulência (CHINA et al., 1996; PENTEADO et al., 2002).

Primers	Seqüência	Temperatura	Tamanho (PB)
STx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	58 ⁰ C	180
STx1R	AGAACGCCCCACTGAGATCATC		
STx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	58 ⁰ C	255
STx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	58 ⁰ C	384
eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
LT-II 1	AGATATAATGATGGATATGTATC	44.9 ⁰ C	300
LT-II 2	TAACCCTCGAAATAAATCTC		

A análise dos produtos obtidos pelo PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cubas de diferentes tamanhos mantendo as seguintes proporções: 5µL de brometo de etídeo (10mg/mL) e 1,5g de agarose para cada 100mL de tampão TBE. Inicialmente, a quantidade exata de agarose (Sigma) foi pesada e transferida para um erlenmeyer, no qual foi adicionado o tampão TBE, completando o volume adequado. A mistura foi aquecida em forno microondas até que a agarose estivesse completamente dissolvida no tampão.

A análise dos produtos de PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, podendo variar de tamanho (já que diferentes cubas eletroforéticas comportam diferentes volumes de gel), com 1,5g de agarose para cada 100mL de tampão TBE. O gel, ainda em estado líquido foi vertido sobre um suporte de acrílico contendo um ou dois pentes. Depois de solidificado, o gel foi colocado dentro da cuba de eletroforese e preenchida com tampão TBE. Os pentes foram retirados do gel, deixando presentes várias canaletas, nas quais foram aplicadas as amostras e um marcador de peso molecular (fago ΦX 174 Hae III digest – Pharmacia).

As amostras, antes de serem aplicadas no gel, foram acrescidas de brometo de etídeo, o brometo é um agente intercalante do DNA, que permite a visão deste quando exposto à luz ultravioleta. A cuba foi ligada a uma fonte de corrente elétrica, fazendo com que o DNA, molécula carregada negativamente, migrasse em direção ao pólo positivo. Neste processo, fragmentos de DNA com diferentes pesos moleculares, migraram em diferentes velocidades, fazendo com que eles se separassem no gel.

Após a corrida eletroforética (20V), o gel foi colocado em um transiluminador, e exposto a radiação ultravioleta. O gel foi fotografado (filme Kodak plus X 125) e o tamanho dos fragmentos de DNA das amostras inferido por comparação com um marcador de peso molecular, que tem fragmentos de tamanho conhecidos.

ERIC-PCR

A técnica de ERIC-PCR foi realizada em 153 isolados pertencentes a sorogrupos EPEC/STEC e/ou portadores de genes de virulência. Devido ao grande número de isolados, estes foram separados e analisados em 4 grupos de amostras: Figura 5 (água, leite e fezes-sorogrupos O158 e O142 de todas as propriedades), Figura 6

(água, leite e fezes-sorogrupos O55, O114, O26, O125, O126, O111 de todas as propriedades), Figura 7 (Somente isolados STEC oriundos das fezes dos animais e do leite do tanque de expansão da propriedade número 7), Figura 8 (Somente isolados STEC e ETEC oriundos das fezes dos animais da propriedade número 7). A propriedade número 7 foi analisada separadamente, pois foi o local onde se detectou o maior número de linhagens STEC e ETEC.

O DNA genômico foi amplificado por PCR (39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, com extensão final de 72°C por 10 minutos), utilizando como iniciadores as seqüências ERIC 1 (5'-ATGTAACCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') descritos por VERSALOVIC et al. (1991). O produto da reação amplificado foi visualizado em gel de eletroforese contendo 10 uL do produto de PCR e 1,5% de gel de agarose. Foi utilizado o marcador molecular Φ X-174 Hae III digest. A matriz de similaridade foi construída através do programa Freetree (versão 0.9.1.50) e a árvore foi obtida e visualizada pelo programa Tree View (versão 1.30).

V. RESULTADOS

A Tabela 2 mostra as porcentagens de bovinos que apresentaram, no crescimento bacteriano de amostras de fezes, *Escherichia coli* com as seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* e *LT-II*. Dentre as seqüências, a que apresentou maior taxa de prevalência nas amostras de fezes analisadas, foi a *stx1*(11,4%), seguida pelas *stx2*(7,1%), *LT-II* (6,4%) e *eae*(4,3%). A figura 1 nos mostra a eletroforese do gel de agarose 1,5% de produto de PCR, onde podemos observar amostras positivas para o gene *stx₂* de *E. coli*.

Tabela 2. Número e percentagem de isolados de *E. coli* oriundos de bovinos da região de Ribeirão Preto que apresentaram os genes *stx1*, *stx2*, *eae* ou *LT-II* detectados por reação em cadeia de polimerase. Jaboticabal/SP, 2007.

Seqüências	Positivos	Negativos	Total	F* (%)
<i>stx1</i>	53	414	466	11,4
<i>stx2</i>	33	433	466	7,1
<i>Eae</i>	20	446	466	4,3
<i>stx1+stx2</i>	10	456	466	2,1
<i>stx1+ eae</i>	3	463	466	0,6
<i>stx2 + eae</i>	1	465	466	0,2
<i>stx1+stx2 + eae</i>	1	465	466	0,2
<i>LT-II</i>	30	436	466	6,4

F*- Frequência



Figura 1. Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção dos genes Stx1 e Stx2 de *E. coli*.

R1 e R9: Marcador de peso molecular ØX 174 Hae III Digest (Fragmento 1: 1358pb; Fragmento 2: 1078pb; Fragmento 3: 872pb; Fragmento 4: 603pb; Fragmento 5: 310pb);

R2: Amostra 457 (positiva); R3: Amostra 145 (negativa); R4: Amostra 147 (negativa); R5: Amostra 150 (negativa); R6: Amostra 156 (positiva); R7: Amostra 191 (negativa); R8: Amostra 299 (negativa); R10: Amostra 477 (negativa); R11: Amostra 300 (negativa); R12: Amostra 312 (negativa); R13: Amostra 322 (negativa); R14: Amostra 311 (positiva); R15: Amostra 327 (positiva); R16: Amostra 335 (positiva);

A Tabela 3 apresenta a taxa de prevalência das seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* e *LT-II* no crescimento bacteriano de fezes de bovinos leiteiros, de acordo com a faixa etária dos animais, detectada por PCR. Observou-se um coeficiente de prevalência maior entre bezerros tanto para *stx1*(13,5%) como para *stx2*(9,0%) quando comparado as vacas (*stx1*: 10,3% e *stx2*: 6,2%). Com relação a seqüência *eae* a prevalência entre os bezerros (9,7%) foi bem maior que a das vacas (1,6%). Para *LT-II* a prevalência entre os animais jovens também foi maior (10,3% contra 4,5%).

Tabela 3. Número e percentagem de isolados de *E. coli* oriundos de amostras de fezes de bovinos da região de Ribeirão Preto que apresentaram os genes *stx1*, *stx2*, *eae* ou *LT-II* detectados por reação em cadeia de polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal/SP, 2007.

Categoria Animal	Seqüências	Positivos	Negativos	Total	F* (%)
Bezerros	<i>stx1</i>	21	134	155	13,5
	<i>stx2</i>	14	141	155	9,0
	<i>eae</i>	15	140	155	9,7
	<i>LT-II</i>	16	139	155	10,3
Vacas	<i>stx1</i>	32	279	311	10,3
	<i>stx2</i>	19	292	311	6,2
	<i>eae</i>	5	306	311	1,6
	<i>LT-II</i>	14	297	311	4,5

F*- Frequência

Nenhum crescimento obtido de amostras de água apresentou seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* ou *LT-II*. Entretanto três amostras de leite (13,6%) foram positivas para o gene *stx1*, uma (4,5%) para o gene *stx2* e outra (4,5%) para o gene *LT-II* conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Número e percentagem de isolados de *Escherichia coli* oriundos de amostras de água e leite que apresentaram as seqüências stx1, stx2, eae ou LT-II detectadas por reação em cadeia de polimerase. Jaboticabal/SP, 2007.

Fonte	Seqüências	Positivos	Negativos	Total	F* (%)
Água	stx1	0	21	21	0
	stx2	0	21	21	0
	eae	0	21	21	0
	LT-II	0	21	21	0
Leite	stx1	03	18	22	13,6
	stx2	01	20	22	4,5
	eae	0	21	22	0
	LT-II	01	20	22	4,5

F*- Frequência

Entre os sorogrupos que apresentaram alguma das seqüências, destacam-se o O114, O142, O125, O55, O126, O158 e O157. Os dois sorotipos O157:H7 apresentaram ambos os genes *stx1* ou *Stx₂* e *eae*, e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Isolados de *Escherichia coli* de amostras de leite e fezes de bovinos que apresentaram seqüências dos genes stx1, stx2, eae, hemólise e os sorogrupos/sorotipos.

Fonte	NºAmostra	stx1	stx2	eae	hemólise	Sorogrupo/Sorotipo
Vaca	09	+	-	-	-	O114
Vaca	22	-	+	-	-	O114
Vaca	24	+	-	-	+	NT
Bezerro	28	+	+	-	-	O142
Bezerro	31	-	-	+	+	NT
Bezerro	33	-	+	-	-	NT
Bezerro	35	-	-	+	-	NT
Bezerro	36	-	+	-	+	NT
Vaca	41	+	-	-	-	O125
Vaca	43	+	-	-	-	O55
Bezerro	45	+	-	-	-	NT
Vaca	54	+	-	-	+	NT
Vaca	56	+	-	-	-	NT
Vaca	59	+	-	-	+	NT
Bezerro	63	-	+	-	+	NT

Vaca	83	+	-	-	-	NT
Bezerro	89	+	-	-	-	NT
Bezerro	96	+	+	-	+	NT
Vaca	110	-	+	-	-	NT
Vaca	115	+	-	-	-	NT
Vaca	117	+	-	-	+	NT
Vaca	124	+	-	-	+	NT
Vaca	138	-	-	+	+	NT
Vaca	140	-	+	-	-	NT
Vaca	141	+	-	-	-	NT
Vaca	150	+	-	-	-	NT
Vaca	156	-	+	-	-	NT
Vaca	162	+	-	-	-	O55
Vaca	183	-	+	-	+	NT
Vaca	185	-	+	-	-	NT
Vaca	186	-	-	+	+	NT
Vaca	191	+	-	-	-	O126
Bezerro	216	+	+	-	-	NT
Bezerro	221	+	+	-	+	NT
Bezerro	223	-	-	+	-	NT
Vaca	235	-	+	-	-	NT
Vaca	236	-	+	-	+	NT
Vaca	237	-	-	+	+	NT
Bezerro	240	+	+	-	-	NT
Vaca	249	+	+	-	+	NT
Bezerro	252	-	-	+	-	NT
Bezerro	253	-	-	+	-	NT
Bezerro	262	-	-	+	-	NT
Bezerro	271	-	-	+	-	NT
Bezerro	275	+	-	-	-	NT
Leite	288	+	-	-	+	NT
Leite	293c	-	+	-	+	NT
Leite	293d	+	-	-	-	NT
Vaca	299	+	-	-	+	NT
Vaca	300	+	-	-	-	NT
Vaca	307	-	-	+	-	O158
Vaca	311	-	+	-	+	NT
Vaca	312	+	-	-	-	NT
Vaca	317	+	-	-	-	NT
Vaca	318	+	-	-	-	NT
Vaca	319	+	-	-	+	NT
Vaca	322	+	-	-	-	NT
Vaca	327	-	+	-	-	NT
Vaca	335	-	+	-	+	NT
Vaca	340	-	-	+	+	NT
Vaca	342	+	-	-	+	NT
Vaca	344	+	-	-	-	NT

Vaca	345	+	-	-	-	NT
Vaca	347	-	+	-	+	NT
Vaca	351	+	-	-	-	NT
Bezerro	369	+	-	-	+	NT
Bezerro	370	+	-	-	-	NT
Bezerro	372	-	-	+	-	NT
Vaca	378	+	-	-	-	NT
Vaca	380	-	+	-	-	NT
Vaca	382	-	+	-	-	NT
Vaca	383	+	+	-	-	NT
Vaca	391	-	+	-	+	NT
Vaca	408	+	-	-	-	NT
Vaca	443	-	+	-	-	NT
Bezerro	456	+	+	+	-	NT
Bezerro	457	+	+	-	-	NT
Bezerro	459	-	+	-	-	NT
Bezerro	460	-	-	+	-	NT
Bezerro	462	+	-	+	+	O157:NM
Bezerro	463	+	-	+	+	O157:H7
Bezerro	466	+	-	-	-	NT
Bezerro	468	+	-	-	-	NT
Bezerro	470	+	-	-	-	NT
Bezerro	471	+	+	-	-	NT
Bezerro	472	+	-	+	+	O157:NM
Bezerro	473	-	+	+	-	O157:H7
Bezerro	474	-	+	-	+	NT
Bezerro	476	+	-	-	-	NT
Bezerro	477	+	-	-	-	NT
Bezerro	479	-	-	+	-	NT
Leite	489	+	-	-	-	NT

NT: Não sorotipada;

As figuras 2, 3 e 4 nos apresentam a eletroforese do gel de agarose 1,5% de produto de PCR, onde podemos observar as bandas formadas pelo ERIC, amostras positivas para todos os genes pesquisados e amostras positivas para LT-II, respectivamente.

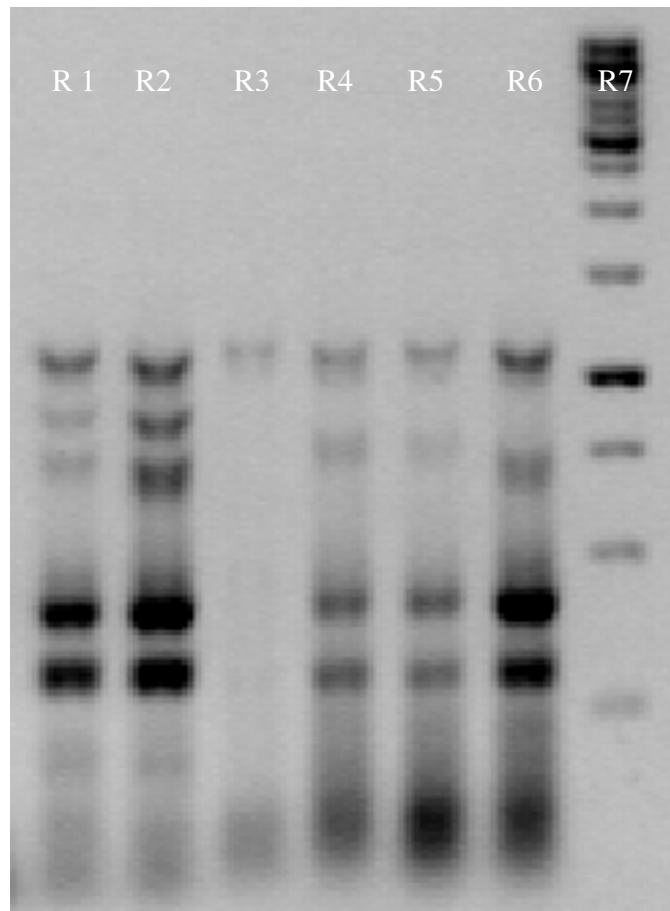


Figura 2. Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2.

R1: isolado de leite; R2: isolado de fezes; R3: controle negativo; R4: isolado de fezes; R5: isolado de fezes; R6: isolado de leite; R7: Marcador molecular (1Kb).

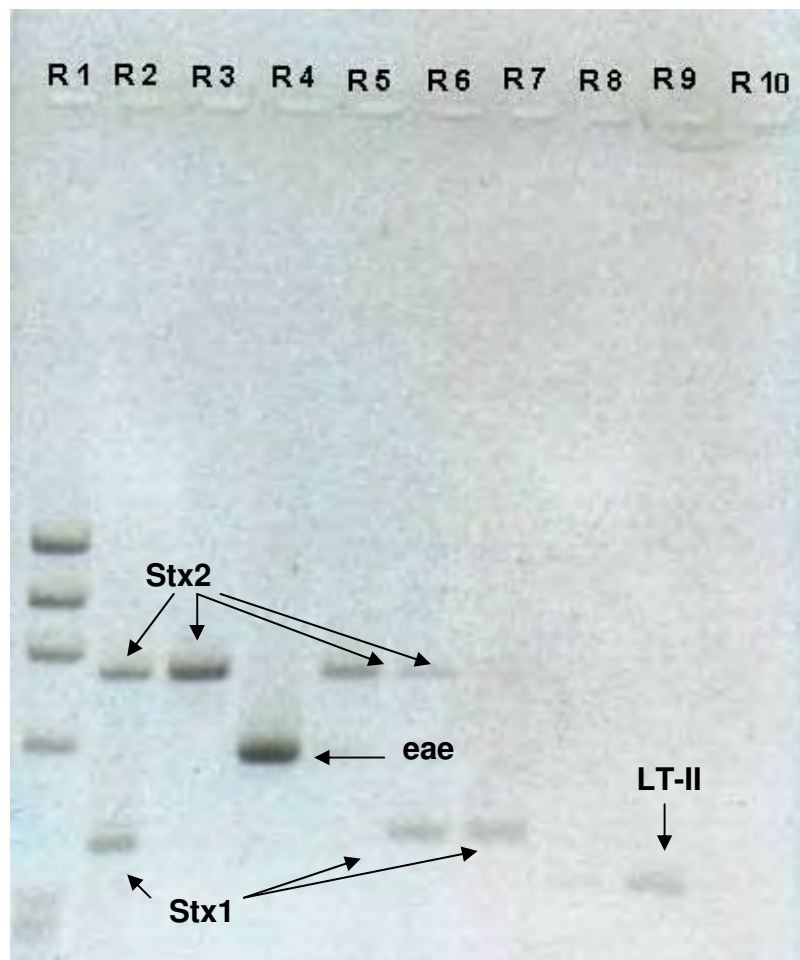


Figura 3 . Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção dos genes Stx1, Stx2, eae e LT II de *E. coli*. R1 : Marcador de peso molecular ØX 174 Hae III Digest (Fragmento 1: 1358pb; Fragmento 2: 1078pb; Fragmento 3: 872pb; Fragmento 4: 603pb; Fragmento 5: 310pb); R2: Stx1 + Stx2 ; R3: Stx2; R4: eae ; R5: Stx2; R6: Stx1 + Stx2; R7: Stx1; R9: LT II; R10: Branco da reação;

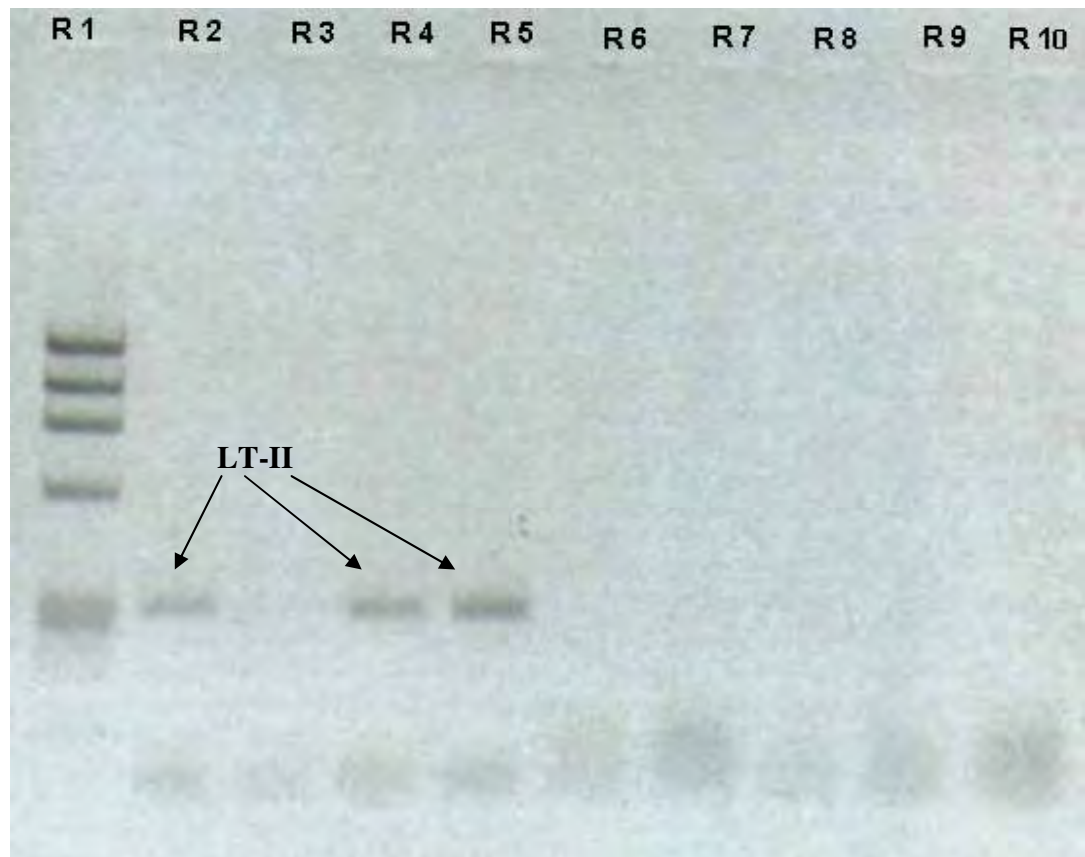


Figura 4 . Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene LT-II de *E. coli*. R1: Marcador de peso molecular ØX 174 Hae III Digest (Fragmento 1: 1358pb; Fragmento 2: 1078pb; Fragmento 3: 872pb; Fragmento 4: 603pb; Fragmento 5: 310pb); R2: Controle; R3: Branco da reação; R4: Positivo (98); R5: Positivo (103); R6: Negativo (81); R7: Negativo (82); R8: Negativo (123); R9: Negativo (124); R10: Negativo (133);

A figura 5 nos apresenta o dendograma comparando os produtos da ERIC-PCR. Comparou-se estirpes isoladas de água, leite e fezes dos isolados totais. Dos isolados de fezes, devido ao grande número, foram selecionados para efeito de comparação as linhagens dos sorogrupos O158 e O142. O dendograma nos apresenta quatro (4) agrupamentos onde pode-se observar similaridade genética entre isolados de fezes, leite e água, tanto no agrupamento B como no C. Estirpes do sorogrupo O142 foram predominantes no agrupamento A, enquanto que nos outros agrupamentos tivemos a predominância do sorogrupo O158.

A figura 6 nos apresenta o dendograma comparando as linhagens isoladas de água e leite, bem como os sorogrupos O55, O114, O26, O125, O126 e O111 identificados em amostras de fezes dos isolados totais. O dendograma nos apresenta três (3) agrupamentos, onde também podemos observar similaridade genética entre isolados de fezes, leite e água, em todos os agrupamentos. Entre os isolados tivemos a distribuição do sorogrupo O55 entre todos os agrupamentos, o sorogrupo O114 foi distribuído apenas nos agrupamentos A1 e B, enquanto que o sorogrupo O125 foi predominante no agrupamento B.

A figura 7 nos apresenta o dendograma comparando somente isolados STEC oriundos das fezes dos animais e do leite do tanque de expansão da propriedade número 7. Neste caso temos 4 (quatro) agrupamentos onde pode-se observar similaridade genética entre isolados STEC oriundos das fezes e do leite no agrupamento C (isolado 8 e 27).

A figura 8 nos apresenta o dendograma comparando somente isolados STEC e ETEC oriundos das fezes dos animais da propriedade número 7. Neste caso temos 6 (seis) agrupamentos que nos mostram uma grande variação na distribuição entre os perfis STEC e ETEC, neste dendograma o método não foi capaz de distinguir estes perfis.

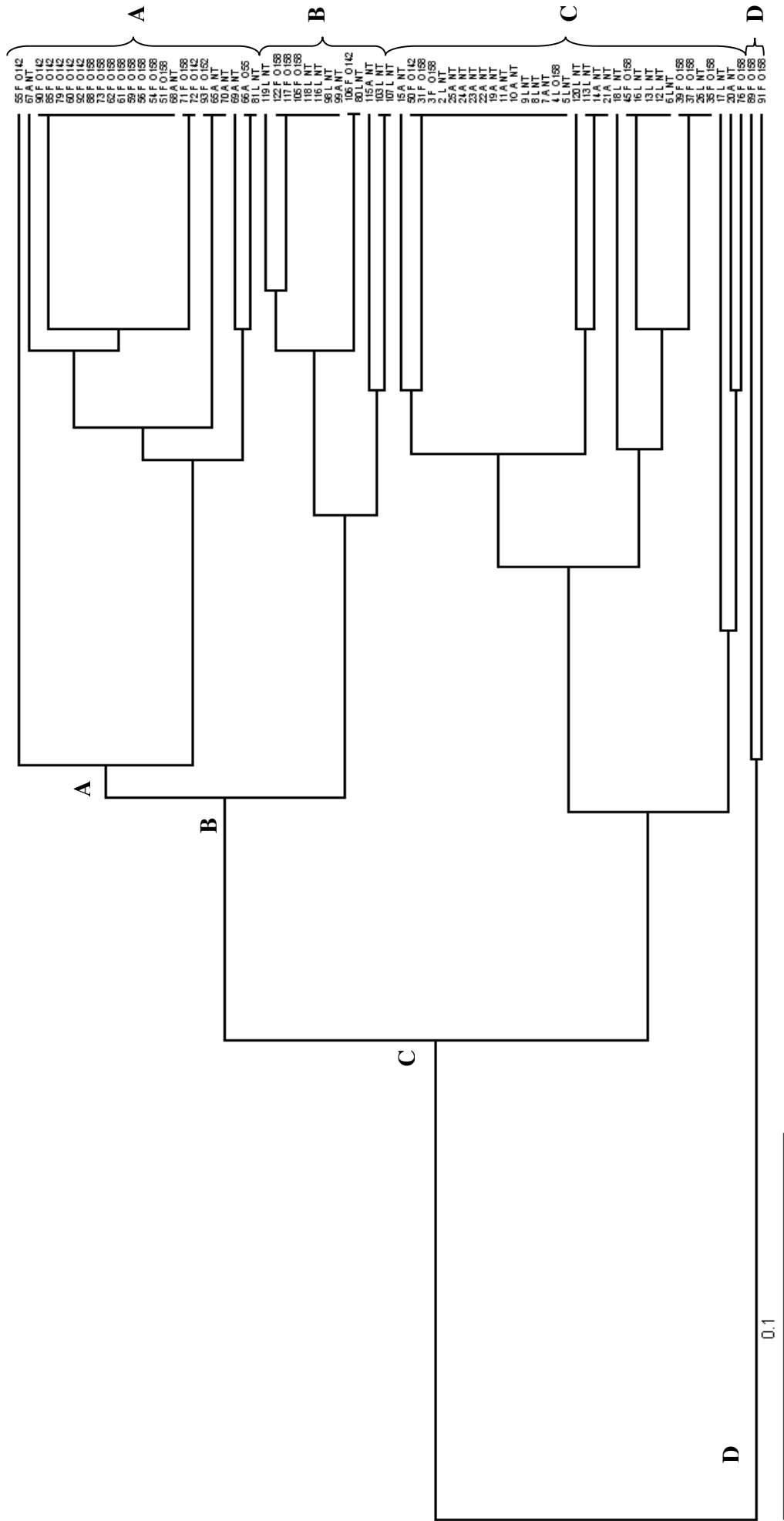


Figura 5. Dendrograma comparando os produtos da PCR dos isolados totais (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2). A: água, L: leite, F: fezes (sorogrupos O158 e O142). NT: não sorotipadas.

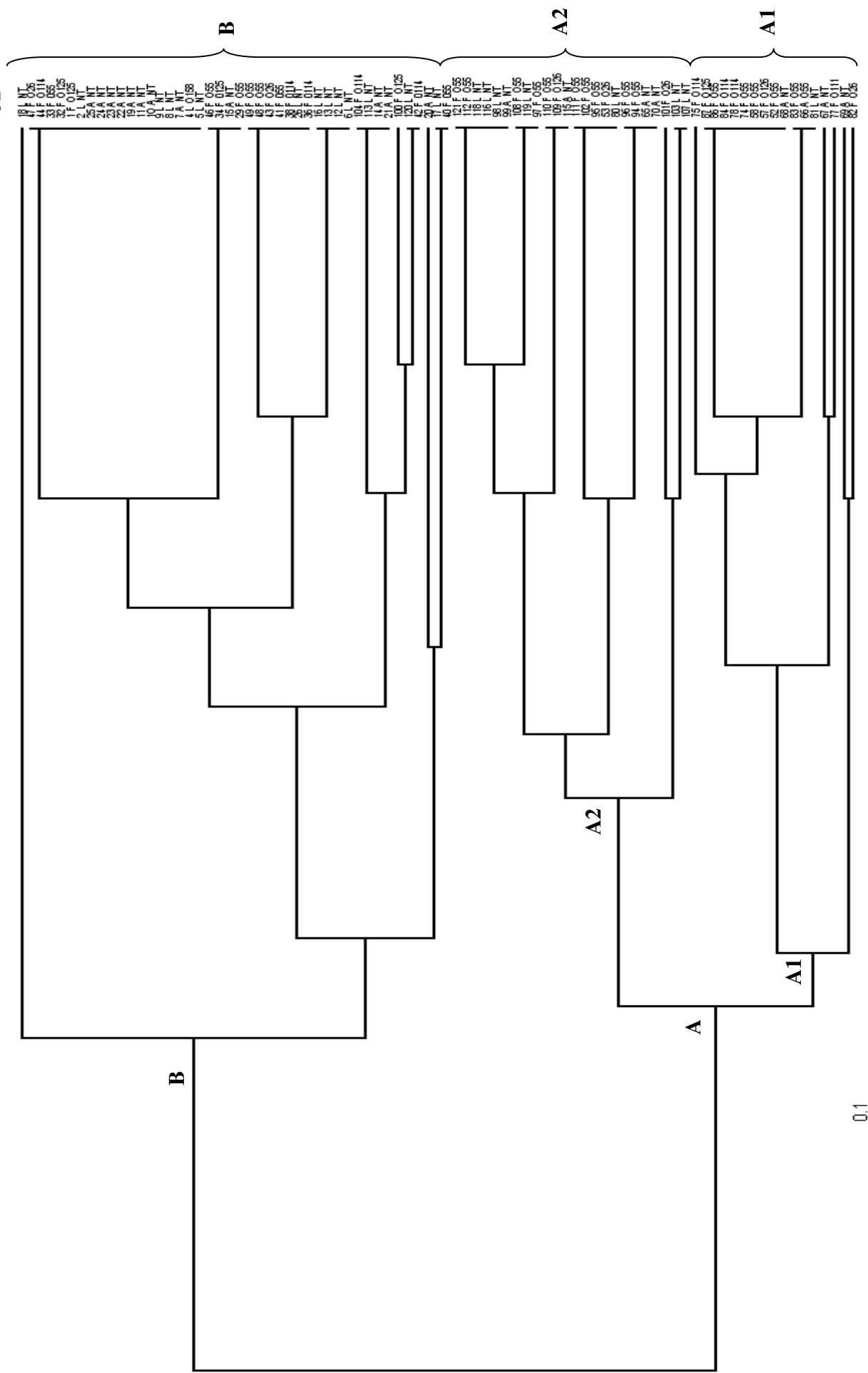


Figura 6. Dendrograma comparando os produtos da PCR dos isolados totais (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2). A: água, L: leite, F: fezes (sorogrupos O55, O114, O26, O125, O126 e O111). NT: não sorotipadas.

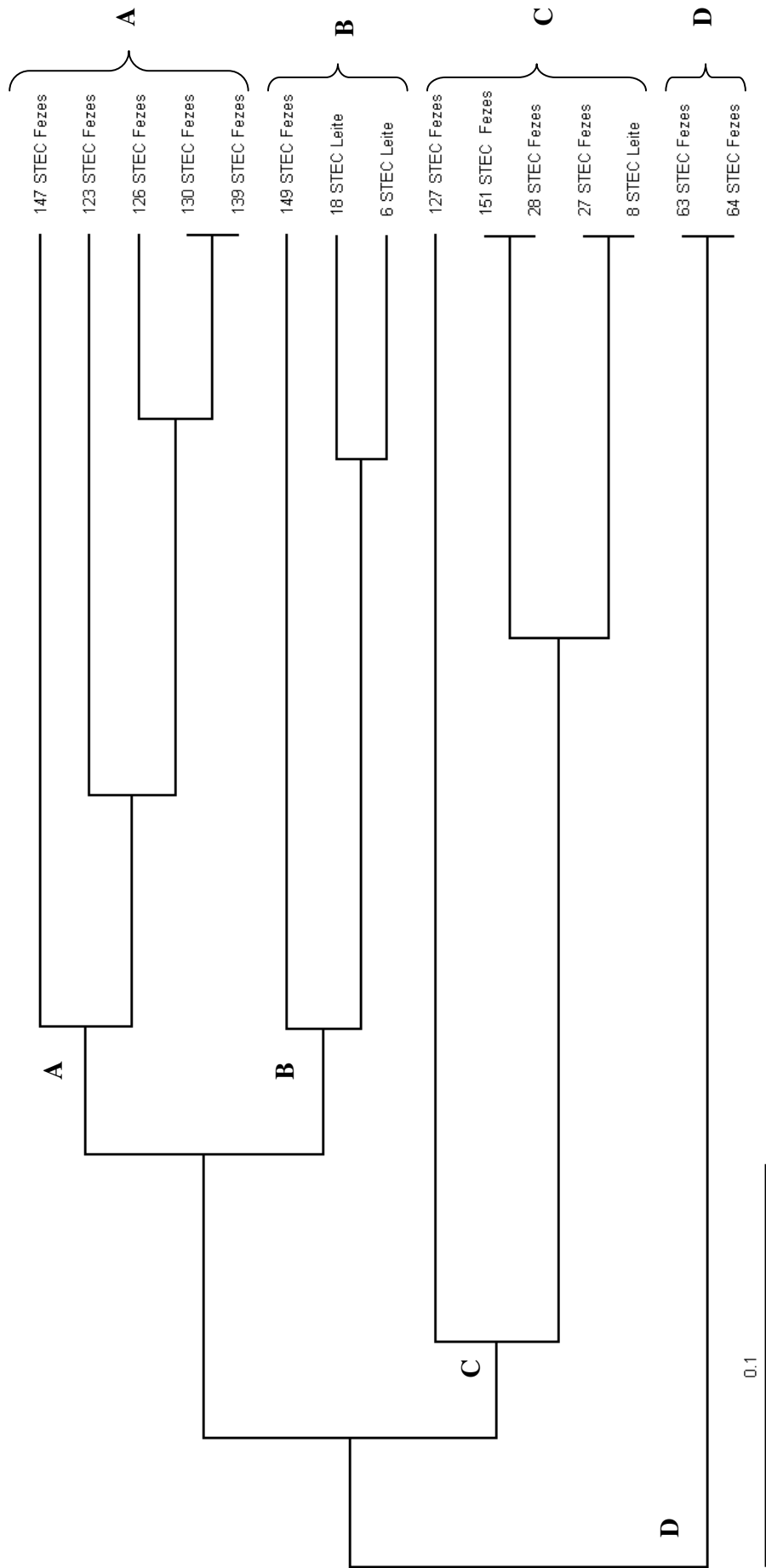


Figura 7. Dendrograma comparando os produtos da PCR dos isolados (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2). Somente isolados STEC oriundos das fezes dos animais e do leite do tanque de expansão da propriedade número 7. H (apresentaram hemólise).

6: stx2 + H	27: O157:NM stx1 + eae + H	64: O157: NM stx1 + eae + H	127: stx1 + H	147: stx2 + H
8: stx1 + H	28: O157: H7 stx1 + eae + H	123: stx2 + H	130: stx1 + H	149: stx2 + H
18: stx1	63: O157: H7 stx2 + eae	126: stx1 + H	139: stx2 + H	151: stx1 + H

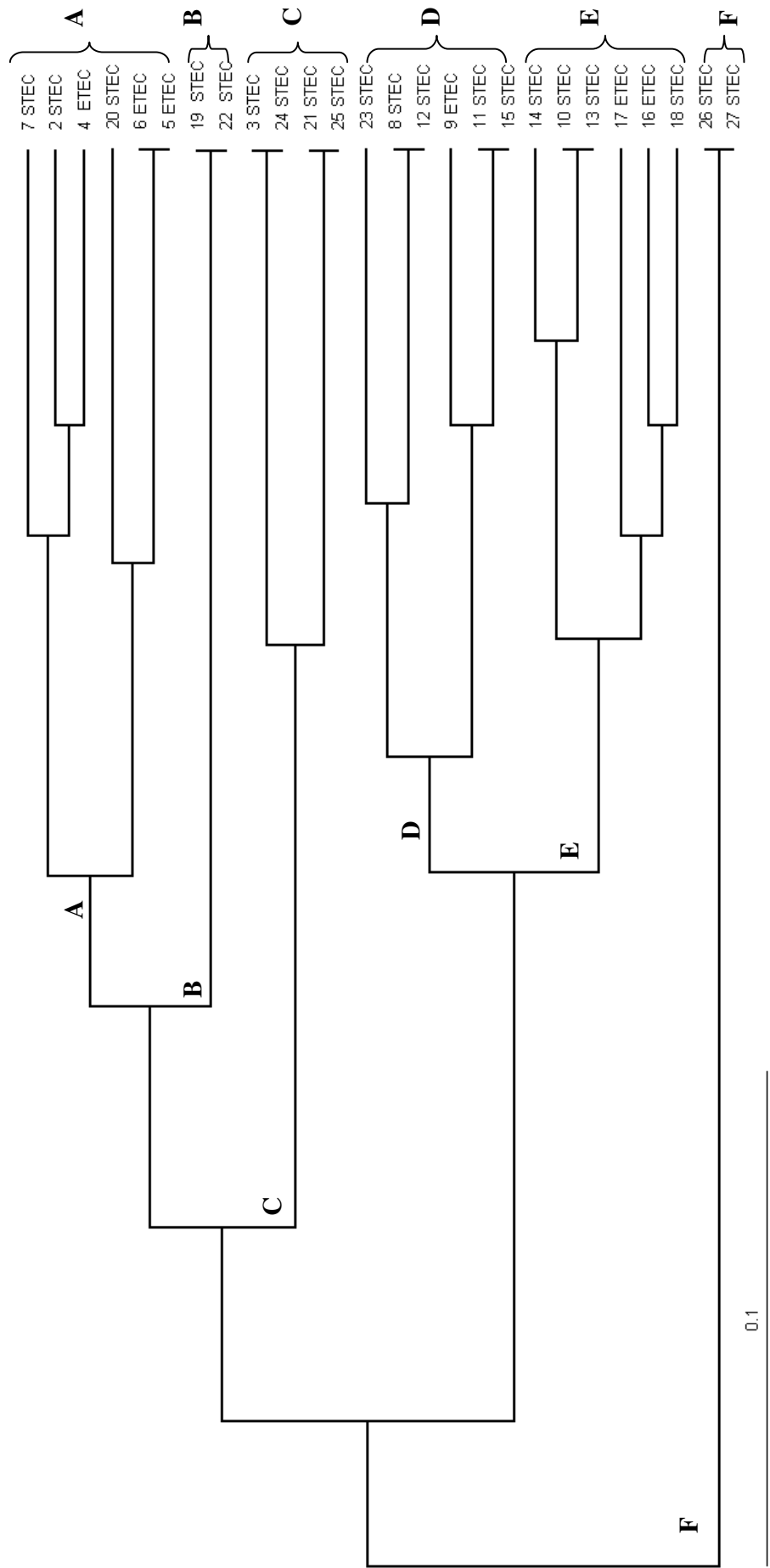


Figura 8. Dendrograma comparando os produtos da PCR dos isolados (amostras de DNA amplificado na presença dos primers Stx1, Stx2, LT-II). Somente isolados STEC e ETEC oriundos das fezes dos animais da propriedade número 7. H (apresentaram hemólise).

VI. DISCUSSÃO

A *E. coli* é uma bactéria que figura como uma espécie predominante entre a flora anaeróbica facultativa normal do intestino do homem e animais, onde desempenha um importante papel na sua fisiologia (BORIE et al., 1997). Entretanto durante as últimas 5 décadas uma grande quantidade de pesquisas, tem estabelecido a *E. coli* entre os importantes agentes etiológicos das enterites, e de graves doenças extraintestinais como, infecções urogenitais, mastite, septicemia e meningite (WASTESON, 2001).

No presente estudo uma frequência de 11,4% para o gene *stx1*, 7,1% para *stx2* e 4,3% para *eae* foi encontrada nas fezes de bovinos pertencentes a rebanhos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP. A frequência geral das STEC foi de 17,6 %. STEC tem sido descrita em vários países, sendo que alguns autores relatam freqüências maiores e outros menores que as obtidas neste trabalho. URDHAL et al. (2003) relatam altíssimas freqüências de STEC em fezes de ovinos (87,6%) e bovinos (64,6%) de uma mesma propriedade rural na Noruega. KOBAYASHI, et al. (2001) examinaram a prevalência de STEC em 78 fazendas no Japão, encontraram linhagens positivas em 46% das amostras de fezes de bezerros, 66% das amostras de novilhas e 69% da amostras de animais adultos. Neste mesmo estudo 72 % dos isolados foram positivos para o gene *hlyA*.

No Brasil CERQUEIRA et al. (1999) relatam uma grande prevalência (71%) de STEC isoladas de amostras de fezes de bovinos sadios, onde a prevalência em bovinos leiteiros foi maior que a de bovinos de corte, 82% e 53% respectivamente; entre as linhagens positivas prevaleceu as seqüências *stx1/stx2* em bovinos leiteiros (69%) e a seqüência *stx1* foi a mais freqüente entre os bovinos de corte; No Canadá, uma pesquisa realizada com gado leiteiro mostrou uma prevalência de 45% de STEC (JOHNSON et al. 1996). E na Suíça BUSATO et al. (1999) detectaram STEC em 44,3 % dos animais de propriedades leiteiras. Na Argentina relatou-se uma prevalência de 44,0% em bovinos adultos (SANZ et al. 1998). TRISTÃO et al. (2007) identificaram linhagens STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro e 28%

no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que bovinos saudáveis no Brasil podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Na Noruega VOLD et al. (1998) obtiveram uma frequência de 7% para *stx*₁ e/ou *stx*₂ em isolados de fezes de bovinos. Na França FREMAUX et al. (2006) pesquisando isolados de fezes e ambientais, em fazendas leiteiras, encontrou o gene *stx* em 35% das amostras de fezes e em 20% das amostras ambientais, 46% das STEC eram positivas para *stx*₁ e 86% para *stx*₂, 29% para o gene *eae* e 92% para enterohemolisina, 16% das STEC carregavam todos os genes pesquisados. LEOTTA et al. (2006) demonstram que não somente animais domésticos albergam STEC, em seu estudo encontraram uma frequência para STEC de 50,8% em fezes de mamíferos selvagens de um Zoológico e de um Jardim botânico na Argentina.

A frequência dos genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae* foi maior entre os animais jovens (bezerros), estes resultados estão de acordo com os descritos por vários autores como ZHAO et al. (1995), BUSATO et al. (1999) e WELLS et al. (1991). ISA (2003) relata uma alta prevalência (59,9%) de seqüências *stx* em fezes de bovinos leiteiros no município de Jaboticabal-SP, onde 57% em bezerros, 69,9% em novilhas e 47,6% em animais adultos (vacas), quando constatou-se uma frequência de 45,8% para a seqüência *eae*. Entretanto também no Brasil MOREIRA et al. (2003) usando ensaio com células vero obtiveram 49% de amostras positivas para STEC em fezes de bovinos, onde a maior frequência foi nas fezes de novilhas (57%) seguido por animais adultos (52%) e bezerros (44%). Em rebanhos brasileiros PIGATTO et al. (2008) encontraram 36% de STEC em fezes de bovinos sadios, de 33 diferentes sorotipos, entre os genes encontrados o *stx*₁ estava presente em 10 % dos isolados, *stx*₂ em 43%, *stx*₁ mais *stx*₂ em 47% e *eae* em 1%.

Ainda no Brasil, LEOMIL et al. (2003) evidenciaram os bovinos jovens como reservatórios de STEC e EHEC, em seu estudo os autores encontraram uma frequência de 20% de STEC em fezes de bezerros com diarreia e de 7,8% em bezerros sadios, os genes *eae* e *hly* tiveram uma alta frequência nestas linhagens 41,6% e 50,0% respectivamente. Na Alemanha e Bélgica WIELER et al. (1996) isolaram 174 STEC de bezerros com diarreia, onde 70,1% possuíam o gene *eae* e destas 87,7% abrigavam o gene *stx*₁, 10,7% o gene *stx*₂ e 1,6% ambos.

HOLLAND et al. (1999) em seu estudo encontraram mais bezerros sadios albergando eae e eae/stx (40%) que bezerros com diarreia (20%). Na Argentina MEICHTRI et al. (2004) examinando fezes de bovinos entre 14 e 16 meses de idade relatou uma frequência de 69% para stx, destas somente 7% carregavam eae e 33,7% possuíam o gene hly; e 4,7% albergavam stx, eae e hly. Neste mesmo estudo foi relatada uma prevalência de 0,5% para a *E. coli* O157:H7. LAHTI et al. (2001) obteve 1,31% de amostras positivas para *E. coli* O157 de amostras de fezes de bovinos na Finlândia, destas todas albergavam o gene eae.

Na Polônia OSEK et al. (2000) encontraram uma frequência de 7,6% de STEC em fezes de bezerros com diarreia, destas 46,7% eram positivas para o gene eae e hlyA. WANI et al. (2005) relataram um surto de diarreia em bezerros de uma propriedade leiteira na Índia, de todos os animais afetados foi isolado o sorotipo O4: NM sendo que todas as estirpes albergavam os genes eaeA e hlyA; e 3 estirpes albergavam o gene stx₁. ORDEN et al. (1998) examinando fezes de bezerros com diarreia encontraram uma frequência de 9,0 % de STEC, sendo que 69,8% albergavam o gene stx₁, 20,9% o gene stx₂ e 9,3 % ambos, neste mesmo estudo constatou-se que 55,8% das STEC albergavam o gene eae coincidentemente somente as linhagens que possuíam o gene stx₁. SALVADORI et al. (2003) examinando amostras de *E. coli* de bezerros com diarreia no centro-oeste brasileiro obtiveram 49,8% de amostras positivas para a produção de toxina: toxina Shiga-like 1 (9,7%), toxina Shiga-like 2 (6,3%), enterohemolisina (6,8%) e LT-II (8,3%), sugerindo que bezerros no Brasil podem ser uma importante fonte de *E. coli* patogênica para animais e humanos.

No nosso trabalho obtivemos crescimento de *E. coli* em amostras de leite que carregavam os genes *stx1* ou *stx2*. LIRA et al. (2004) demonstram o isolamento de STEC de 22 amostras de leite (12,8%) de animais com mastite no Brasil; destas estirpes 50% possuíam o gene eae e 72,7% o gene hly. Também no Brasil CORREA & MARIN (2002) isolaram diferentes sorogrupos de EPEC clássicas (O26, O55, O111, O119) de leite de animais com mastite, destes isolados nove possuíam os genes eae e o fator de aderência EAF. BLANK et al. (2003) relatam o isolamento do sorogrupo O157 de dois casos de crianças com diarreia no Brasil, ambas menores de 12 meses e

hospitalizadas demonstrando diarreia aguda por sete dias com vômito, febre e desidratação.

Os casos de doenças, têm sido associados ao consumo de diferentes categorias de alimentos, e em diferentes locais como creches, domicílios, escolas, centros de recreação aquática, hospitais, enfermarias e especialmente lanchonetes do tipo “fast-foods” e outros estabelecimentos de manipulação e comercialização de alimentos (KEENE, et al., 1994; FENG, 1996). RIBEIRO et al. (1999) associa a CH e a SHU causada pela *E. coli* O157:H7 ao consumo de leite cru e iogurte em diferentes países como EUA, Canadá, Reino Unido e Japão. Diferentes autores têm relacionado a transmissão da *E. coli* O157:H7 ao homem através de diferentes produtos lácteos, como leite cru (MARTIN, et al. 1986), queijo (CARTER, et al., 1987), iogurte (MORGAN, et al., 1993) e até leite pasteurizado (UPTON & COYA, 1994).

A contaminação de carcaças bovinas no processo de abate com fezes de animais infectados, associado ao consumo de produtos e subprodutos cárneos, sem apropriado processo térmico na preparação, especialmente hambúrgueres, provavelmente permite a manutenção do microrganismo no interior da carne, onde a relação tempo/temperatura do processamento pré-consumo não é suficientemente adequada para a sua inativação (HART et al., 1997). BARLOW et al. (2006) relatam o isolamento de 16% de STEC de amostras de carne moída, desses 95% demonstraram possuir o gene *stx*₁ e 65% o gene *ehx* (enterohemolisina).

Dados alertam para a contaminação de outros alimentos como batata, alface, broto de rabanete e sugerem a veiculação através das fezes de animais infectados ou em alimentos adubados com material fecal animal, proveniente principalmente da espécie bovina, visto que, experimentalmente, o sorotipo O157:H7 pode permanecer viável em fezes bovinas por 42 a 49 dias, a 37°C, e por 49 a 56 dias, a 22°C (WANG, et al., 1996).

Os dois sorotipos O157:H7 isolados no presente trabalho apresentaram os genes *stx1* ou *stx2* e *eae* (Tabela 5). CERQUEIRA et al. (1999) relatam o isolamento de três linhagens O157:H7 de rebanhos bovinos no Brasil, sendo que duas possuíam os genes *stx2* e uma ambos *stx1/stx2*. IRINO et al. (2005) também no Brasil isolaram duas estirpes O157:H7 entretanto nenhuma portava o gene *stx1* ou *stx2*, portando somente o

gene *eae*. Massa *et al.* (1997) em seu estudo sugere que a *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em produtos lácteos, e que medidas de controle na fabricação destes produtos são fundamentais para diminuir o risco de contaminação.

BIELASZEWSKA *et al.* (2000) relata, que os bovinos podem ser um reservatório de *E. coli* O157:H⁻ produtora de toxina shiga-like, sendo uma fonte para doenças em humanos. COBBOLD & DESMARCHELIER (2000) durante um período de 12 meses coletaram 588 amostras de fezes de bovinos e 147 amostras ambientais de três fazendas leiteiras na Austrália, STEC foram isoladas de 16,7% das amostras de fezes de bovinos e de 4,1% das amostras ambientais; os sorotipos mais freqüentes nas STEC dos bovinos foram a *E. coli* O26:H11 (10,2%) e O157:H7 (11,2%), neste mesmo estudo os autores sustentam que os bovinos de 1 a 14 semanas de idade são o reservatório primário das STEC e EHEC em fazendas leiteiras.

HUSSEIN e BOLLINGER (2005) relatam que pesquisas mundiais de eliminação de STEC pelos bovinos demonstram taxas de prevalência de 0,01% a 54,2% para cepas O157 e de 1,7% a 62,5% para cepas de outros sorogrupos.

Ambas espécies de *E. coli*, patogênica ou não patogênica, podem ser hábeis para colonizar o intestino humano, diferindo somente na presença de genes funcionais, que permitem aumentar a aptidão da bactéria, possibilitando sucesso na colonização do hospedeiro ou codificando traços específicos de virulência (GROZDANOV *et al.* 2004).

As *E. coli* que causam doenças diarreicas, são classificadas em grupos patogênicos de acordo com as propriedades de virulência, mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos e sorologia (WASTESON, 2001). MELLIES *et al.* (1999) sugerem que mecanismos de virulência associados, codificados por genes localizados em fagos, ilhas de patogenicidade no cromossomo, chamadas de LEE e plasmídeos são fundamentais para provocar a doença.

Na França PRÈRE *et al.* (2006) analisando amostras de fezes de crianças hospitalizadas com diarreia, obteve uma grande freqüência de EPEC (55%) e EHEC (9%) entre as amostras, demonstrando a importância desses microrganismos na etiologia da doença em crianças de até dois anos de idade. No Brasil KOBAYASHI *et al.* (2000) identificaram 11% de EPEC típicas, ou seja, possuíam os genes *bfp*, *eae* e o plasmídeo EAF, de crianças com diarreia em Londrina no Estado do Paraná. Em

Brasília, PIVA et al. (2003) estudando diarreia de crianças e adultos obtiveram uma alta frequência de EPEC (56%) em crianças, enquanto nenhuma estirpe EPEC foi isolada de adultos.

KADDU-MULINDWA et al. (2001) caracterizando estirpes de *E. coli* em amostras de crianças com diarreia e gado zebu sadio em Uganda na África, não encontraram correlação; 14,2% das estirpes isoladas de fezes de crianças com diarreia possuíam o gene *eae* e nenhuma a sequência *stx*, entretanto 28,3% dos animais investigados foram positivos para STEC sendo portanto um importante reservatório para este microrganismo.

Populações comensais de *E. coli* que são eliminadas nas fezes dos bovinos, representam um reservatório heterogêneo de sorotipos de *E. coli*, muitos dos quais podem adquirir verocitotoxigenicidade, tornando-se assim potenciais patógenos humanos, principalmente quando contaminam as carcaças (RIGOBELLO et al. 2006) ou o leite (BETTELHEIM, et al. 2005). A *E. coli* shigatoxigênica pode também se disseminar do ambiente da fazenda leiteira e infectar o ser humano pelo contato com os animais (MIDGLEY et al., 1999).

Considerando a larga distribuição das STEC em fazendas leiteiras, as altas taxas de prevalência relatadas e o isolamento de sorotipos altamente virulentos de gado leiteiro ou de seus produtos, estratégias de longo prazo para assegurar a qualidade dos alimentos lácteos devem ser desenvolvidas (HUSSEIN e SAKUMA, 2005). Estudos têm demonstrado que a redução da eliminação da *E. coli* O157 pelas fezes dos bovinos poderia diminuir a subsequente contaminação das carcaças (JORDAN et al., 1999).

No presente estudo uma frequência de 6,4% para o gene *LT-II* foi encontrada nas fezes de bovinos sadios pertencentes a rebanhos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP (Tabela 2). Durante as primeiras semanas de vida, distúrbios do trato digestivo têm sido frequentemente relatados na patologia de bezerros. Das diferentes causas de diarreia em bezerros, a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é a mais comum. O desenvolvimento de diarreia por *E. coli* enterotoxigênica depende de dois fatores: colonização do intestino delgado e produção de enterotoxina (HADAD e GYLES, 1982). A colibacilose causada por amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) afeta principalmente animais recém-nascidos e pós-desmame (ACRES, 1985). No Brasil o

primeiro relato de amostra de *E. coli* enterotoxigênica, isolada de fezes de bezerros com diarreia contendo o gene para codificação da enterotoxina LT-II foi descrito por UGRINOVICH et al. (2002).

Esta enfermidade é responsável por sérios danos econômicos para criadores de gado bovino, no Brasil (CASTRO e YANO, 1992) e em outros países. (BLANCO *et al.*, 1991, BLANCO et al., 1997). As amostras de ETEC de origem bovina não produzem LT-I (BLANCO et al., 1991), existindo apenas a descrição de amostras produtoras de LT-II (SERIWATANA et al., 1988).

Vários trabalhos demonstram a presença do gene LT-II, entre búfalos, foram encontrados 7 espécimes fecais LT-II, num total de 11 materiais examinados (64%). De carne bovina obtida em mercados, 4% foram positivas para a presença dos genes que codificam para LT-II, sendo que apenas 2% de fezes humanas foram positivas neste trabalho (SERIWATANA et al., 1988).

Neste estudo uma amostra de leite também foi positiva para LT-II. No Brasil, examinando 96 amostras de alimentos de origem animal, FRANCO et al. (1991) pesquisando 306 isolados de *E. coli*, encontraram quatro amostras LT-II positivas. Em outra pesquisa realizada na Tailândia, amostras LT-II foram encontradas em alimentos de origem animal, mas não foram isoladas amostras LT-II de fezes de crianças (RASRINAUL et al., 1988).

A prevalência de LT-II entre isolados de animais jovens também foi maior, 10,3% contra 4,5% das vacas. SALVADORI et al. (2003) encontrou 8.3% de genes LT-II em isolados de *E. coli* de bezerros com diarreia no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. UGRINOVICH et al. (2002) relatam uma frequência de 1,92 % em amostras de bezerros com diarreia.

Genes que codificam LT-II tem sido detectados em estirpes isoladas de humanos, bovinos e búfalos (SERIWATANA *et al.*, 1988). A LT-II demonstra alguma homologia com a subunidade A, de LT-I e da Enterotoxina da Cólera (CT), mas não demonstra homologia com a subunidade B (GUTH et al., 1997; SEARS e KAPER, 1996). ETEC é também associada à diarreia em crianças de países em desenvolvimento e viajantes, e a contaminação de água e alimentos é a principal causa das altas taxas de incidência da doença nestas regiões (NATARO e KAPER, 1998).

Investigações epidemiológicas tem demonstrado que a contaminação de água e alimentos atua como principal veículo de infecção pela ETEC (LONG *et al.*, 1994).

Análises baseadas na distribuição de seqüências ERIC foram previamente conduzidas em estirpes ambientais de varias espécies bacterianas como a *Shigella sonnei* (IBENYASSINE *et al.*, 2006). ERIC-PCR parece ser relevante para a discriminação genotípica de enterobactérias como a *E. coli* (WIECZOREK *et al.* 2004). LIU *et al.* (1995) ainda citam que a habilidade da ERIC-PCR para discriminar clones bacterianos é equivalente a PFGE (eletroforese em campo pulsado). LEUNG *et al.* (2004) estudando a capacidade discriminatória da ERIC-PCR de isolados de bovinos, suínos e humanos, afirmam que o método não foi efetivo para distinguir *E. coli* de fontes humanas e animal, esta incapacidade foi explicada pelo limitado número de fragmentos de DNA gerados pelo método naquelas linhagens. IBENYASSINE *et al.* (2006) comparando o perfil genotípico, pela ERIC-PCR, de estirpes de *E. coli* isoladas de vegetais, solo e água, coletados do mesmo ambiente em épocas distintas, demonstraram que estas estirpes possuíam o mesmo perfil.

COSTA *et al.* (2006) realizando caracterização epidemiológica de isolados de *E. coli* de suínos afirmam que a ERIC-PCR não demonstrou poder discriminatório, apesar de permitir a separação dos isolados em grupos, estes não evidenciaram grupos relacionados aos fatores de virulência.

O dendograma ERIC (Figura 7) deste trabalho demonstra a mobilidade de isolados STEC entre as fezes dos animais e o leite produzido na propriedade (isolado 8 e 27), um perigo potencial a saúde dos consumidores.

SILVEIRA *et al.* (2002) pesquisando *E. coli* aviária (APEC) agruparam seus isolados patogênicos e não patogênicos em diferentes grupos utilizando ERIC-PCR, sugerindo que genótipos específicos são responsáveis por cada tipo de doença.

WARRINER *et al.* (2002) através da mesma técnica demonstrou a contaminação cruzada de carcaças e equipamentos em uma abatedouro de suínos.

A implementação de estratégias de controle em propriedades rurais são importantes, entretanto podem ser de difícil realização em fazendas onde animais são continuamente introduzidos, grupos de animais de diferentes idades são criados

conjuntamente, onde temos limitadas possibilidades de aplicar medidas de controle de higiene e finalmente novilhas enviadas a outras propriedades podem contribuir para a futura disseminação do agente (CONEDERA et al., 2001).

Esforços para implementar práticas, em frigoríficos e outras indústrias, que venham a reduzir a contaminação cruzada entre alimentos de diferente origens são fundamentais para solucionar a infecção por STEC oriunda dessas fontes. Programas de saúde pública, enfatizando o perigo de se consumir leite cru e carne mal cozida também são necessários. Programas de análise de perigos de pontos críticos de controle (APPCC) utilizados na indústria são fundamentais para assegurar a qualidade dos produtos de origem animal, estes programas identificam e controlam a contaminação e a possível transmissão de patógenos. Uma ação conjunta entre as propriedades rurais integradas a indústria é fundamental para minimizar o risco de patógenos entrarem na cadeia alimentar humana.

Medidas de contenção e controle dos níveis de contaminação nas propriedades e nos alimentos de origem animal seriam: somente adquirir animais negativos para STEC/ETEC, testar os animais ao introduzi-los na propriedade, descartar animais positivos e obtenção higiênica do leite.

VII. Conclusões

1. As seqüências de genes *stx1* de *Escherichia coli* foram as que apresentaram maior frequência nas fezes dos bovinos. Os dois sorotipos O157:H7 isolados possuem genes de virulência e são potenciais estirpes enterohemorrágicas.
2. Os bezerros apresentaram uma maior frequência para todos os genes pesquisados. Seqüências de genes *stx1*, *stx2* e LT-II foram identificadas em isolados de leite.
3. As linhagens isoladas de água, leite e fezes apresentaram similaridade genética. As fezes bovinas representam uma importante fonte de contaminação ambiental para STEC e ETEC.

VIII. REFERÊNCIAS

ACRES, S.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **J Dai Sci**, v.65, p.3547-3555, 1985.

AGBODAZE, D. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. Oxford, n.22, p.221-230, 1999.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M.; SCHWEIGER, P.; RAMMER, H. P.; RESCH, A.; DIERICH, M. P.; FRIEDRICH, A. W.; KARCH, H. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurized milk. **Eurosurveillance**. London, n.10, v.6, p.147-151, 2001.

ANSARUZZAMAN, M. Clonal groups of enteropathogenic *E. coli* in case-control studies of diarrhoea in Bangladesh. **J Med Microbiol**. Edinburg, n.49, p.177-185, 2000.

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

BARLOW, R. S.; GOBIUS, K. S.; DESMARCHELIER, P. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. **International J Food Microbiol**. V.111, p.1-5, 2006.

BARRETT, T.; KAPER, J. B.; JERSE, A. E.; WACHSMUTH, I. K. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. **Journal of Infect Dis**. Chicago, v. 165, p. 979-980, 1992.

BETTELHEIM, K. A.; KUZEVSKI, A.; GILBERT, R. A.; KRAUSE, D. O.; McSWEENEY, C. S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **J Appl Microbiol.** Oxford, n.98, p.699-709, 2005.

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

BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence markers of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from Healthy domestic animals of different species. **J Clin Microbiol.** Washington, v.33, n.3, p.631-635, 1995.

BEUTIN, L., GEIER, D., ZIMMERMANN, S., ALEKSIC, S., GILLESPIE, H. A., WHITTAM, T. S. Epidemiological Relatedness and Clonal Types of Natural Populations of *Escherichia coli* Strains Producing Shiga Toxins in Separate Populations of Cattle and Sheep. **Appl Envir Microbiol** n. 63, 2175-2180, 1997.

BIELASZEWSKA, M.; SCHMIDT, H.; LIESEGANG, A.; PRAGER, R.; RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; CIZEK, A.; JAFDA, J.; BLAHOVA, K.; KARCH, H. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting shiga toxin- producing *Escherichia coli* O157:H- strains and a source of human diseases. **J Clin Microbiol.** Washington, v.38, n.9, p.3470-3473, 2000.

BLANCO, J., BLANCO, M., GARABAL, J.I., *et al.* Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. **Microbiologia SEM**, v.7, p.57-72, 1991.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E. *et al.* Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.1446-1451, 1993.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; GONZALEZ, E. A.; ALONSO, M. P.; MAAS, H.; JANSEN, W. H. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). **Eur J Epidemiol.** V. 12, p. 13-19, 1996.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; GONZALES, E. A. *et al.* Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine diarrheogenic *Escherichia coli* belonging to different O:K:H serotypes. Relationship with toxic phenotypes. **J Clin Microbiol**, v.35: 2958-2963, 1997.

BLANK, T. E.; LAUCHER, D. W.; SCALETISKY, I. C. A., ZHONG, H., WHITTAM, T. S., DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. **Emerg Infect Dis** n.1, 113-115, 2003.

BOERLIN, P. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. **Cell Mol Life Sci.** Basel, v.56, n.9-10, p.735-741, 1999.

BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALTER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. Manual of clinical Microbiology. Washington DC: ASM press, 1999, p.459-466.

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

BORIE, C.; MONREAL, Z.; GUERREIRO, P.; SANCHES, M. L.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; PRADO, V. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. **Arch Med Vet** Valdivia, v.29, n.2, p.205-212, 1997.

BROTMAN, M.; GIANELLA, R. A.; ALM, P. F.; BAUMAN, H.; BENNETT, A. R.; BLACK, R. E.; BRUHN, C. M.; COHEN, M. B.; GORBACH, S. L.; KAPER, J. B.; ROBERTS, M. R.; STANECK, J. L.; TAYLOR, S.; TROUTT, H. F.; BELL, B. P.; BUCHANAN, R. L.; DURHAM, K.; FENG, P.; FOREMAN, C. T.; GALLER, R. G.; GRAVANI, R. B.; HALL, R. H.; HANCOCK, D. D.; HOLLINGSWORTH, J. Consensus Conference Statement. *Escherichia coli* O157:H7 infections-an emerging national health crisis, July 11-13, 1994. **Gastroenterology**. Duluth, n.108, p.1923-1934, 1995.

BUSATO, A.; HOFER, D.; LENTZE, T.; GAILLARD, C.; BURNENS, A. Prevalence and Infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. **Vet Microbiol**. Amsterdam, v.69, p.251-263, 1999.

BUTLER, D.G.; CLARKE, R.C. Diarrhoea and dysentery in calves. In GYLES C.L. (Ed.) *E. coli* in domestic animals and humans. Wallingford: Cab International, 1994. p.91-116.

CARNEIRO, L. A.M.; LINS, M.C.; GARCIA, F.R.A.; SILVA, A.P.S.; MAULLER, P.M.; ALVES, G.B.; ROSA, A.C.P.; ANDRADE, J.R.C.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; QUEIROZ, M.L.P. Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. **Internat J Food Microbiol**. v. 108, p. 15-21, 2006.

CARTER, A. O.; BORCZYK, A. A.; CARLSON, J. A. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7- associated hemorrhagic colitis in a nursing home. **N Engl J Med**., v.317, p.1496-1500, 1987.

CASTRO, A.F.P., YANO, T. Diarréia em Bezerros. Coronel Pacheco, MG : EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa. Gado de Leite., 1992. Cap.1: Etiologia bacteriana da diarréia em bezerros: p.2-8.

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

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex in Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Appl and Envir Microbiol.** V.62, n.9, p. 3462-3465, 1996.

CHANSIRIPORNCHAI, N.; RAMASOOTTA, P.; SASIPREYAJAN, J.; SVENSON, S. B. Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Vet. Microbiol.** n.80, p.77-83, 2001.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; HIGGINS, R. Untreated milk as source of verotoxigenic *E. coli* O157. **Vet Rec.** London, v.133, p.171-172, 1993.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P. A longitudinal study of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. **Vet Microbiol.** V.71, p.125-137, 2000.

COCOLIN, L.; MONZANO, M.; CANTONI, C.; GIUSEPPE, C. A multiplex-PCR method to detect enterhemorrhagic (EHEC) and enterpathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. **Int J Hyg Environ Health.** n.203, p.159-164, 2000.

CONEDERA, G.; CHAPMAN, P. A.; MARANGON, S.; TISATO, E.; DALVIT, P.; ZUIN, A. A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. **Int J Food Microbiol.** V.66, p.85-93, 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. **Vet Microbiol.** V.85, p.125-132, 2002.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq Vet Bras** n.26, p.5-8, 2006.

CRAY, W. C.; MOON, H. W. Experimental Infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157: H7. **Appl Envir Microbiol**. V.61, n.4, p.1586-1590, 1995.

CRAVIOTO, A.; REYES, R. E.; TRUJILLO, F.; URIBE, F.; NAVARRO, A.; DE LA ROCA, J. M.; HERNANDEZ, J. M.; PEREZ, G.; VAZQUEZ, V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. **Am J Epidemiol**. V. 131, p. 886-904, 1990.

CRUMP, J. A.; LANGER, A. J.; GAGE, R.; BAYSINGER, M.; WITHERS, G.; TONEY, D. M.; HUNTER, S. B.; HOEKSTRA, M.; WONG, S. K.; GRIFFIN, P. M.; VAN GILDER, T. J. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. **N Engl J Med**. London, v.347, p.555-560, 2002.

DEAN, A.G.; CHING, Y.; WILLIAMS, R.G. et al. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J Infect Dis**, v.125, p.407-411, 1972.

DESCHÊNES, G.; CASENAVE, C.; GRIMONT, F.; DESENCLOS, J. C.; BENOIT, S.; COLLIN, M.; BARON, S.; MARIAN, P.; GRIMONT, P. A.; NIVET, H. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. **Pediatr Nephrol** Heidelberg, v.10, p.203-205, 1996.

DROLET, R.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J.; HELIE, P. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Can J Vet Res.** Quebec, V. 58, n. 2, p. 87-92, 1994.

DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P.; BENCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington DC: ASM Press, p.171-191, 1997.

EVANS, D.G.; EVANS, D.J.J.R.; PIERCE, N.F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect Immunol**, v.7, p.873-880, 1973.

FENG, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerg Infect Dis.** V. 1, n.2, p.1-9, 1996.

FISCHER, J.; MADDOX, C.; MOXLEY, R.; KINDEN, D.; MILLER, M. Pathogenicity of a bovine attaching and effacing *Escherichia coli* isolate lacking Shiga-like toxins. **Am J Vet Res.** v. 55, p. 991-999, 1994.

FITRHENRY, R. J.; REECE, S.; TRABULSI, L. R.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. **Infect Immun.** V.70, n.8, p.4362-4368, 2002.

FRANCO, B.D., GOMES, T.A., JAKABI, M. Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods. **Intern J Food Microbiol**, v.12, p.333-338, 1991.

FREMAUX, B.; RAYNAUD, S.; BEUTIN, L.; ROZAND, C. V. Dissemination and persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. **Vet Microbiol.** V.117, p.180-191, 2006.

GARBER, L.P.; WELLS, S. J.; HANCOCK, D. D.; DOYLE, M. P.; TUTTLE, J.; SHERE, J. A.; ZHAO, T. Public veterinary medicine: Food safety and handling – Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **J Am Vet Med Assoc.** v.207, p.46-49, 1995.

GAY, C.C.; BESSER, T.E. *Escherichia coli* septicemia in calves. In GYLES, C.L (Ed.). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford: CAB International, 1994, p.75.

GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Enteropathogens associated with acute diarrheal, diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, Chicago, v.164, p.331-337, 1991.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPATHEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cow's milk yogurt and ewes' milk yogurt. **Journal of dairy research.** V.69, p.655-660, 2002.

GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN, J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. (Ed). Infections of the gastrointestinal tract. New York, p.739-761, 1995.

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

GROZDANOV, L.; RAASCH, C.; SCHULZE, J.; SONNENBORN, U.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. **J Bacteriol.** V. 186, N. 16, P.5432-5441,2004.

GUTH, B. E.; TWIDDY, E. M.; TRABULSI, L. R.; HOLMES, R. K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *E. coli*. **Infect Immun.** Vol. 54, p.529-536, 1997.

HADAD, J.J., GYLES, C.L. Scanning and transmission electron microscopic study of the small intestine of colostrum-fed calves infected with strains of *Escherichia coli*. **Am J Vet Res**, v.43, p.41-49, 1982.

HART, C. A.; TREES, A.J.; DUERDEN, I. Zoonoses. **J Med Microbiol.** V&46, p.4-33, 1997.

HEDBERG, C. W.; SAVARINO, S. J.; BESSER, J. M.; PAULUS, C. J.; THELEF, V. M.; MYERS, L. J.; CAMERON, D. N.; BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; OSTERHOLM, M. T. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39: NM: an agent that does not fit into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. **J Infect Dis.** V. 176, n. 6, p. 1625-1628, 1997.

HIRSH, D. C. *Escherichia*. In: HIRSH, D. C.; ZU, Y. C. Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro, p.63-68, 2003.

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

HORNITZKY, M. A.; VANSELOW, B. A.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K. A.; CORNEY, B.; GILL, P.; BAILEY, G.; DJORDJEVIC, S. P. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. **Appl Environ Microbiol.** Washingtgn, v.68, n.12, p.6439-6445, 2002.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacterial. **Mol Microbiol.** N.5, p.825-834, 1991.

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Beef. **Meat Science.** V.71, p.676-689, 2005.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **J Dairy Sci.** Champaign, n.88, p.450-465, 2005.

IBENYASSINE, K.; AITMHAND, R.; KARAMOKO, Y.; CHOEN, N.; ENNAJI, M.M. Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated irrigation water. **Lett Appl Microbiol.** V.43, p.528-533, 2006.

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

ISA, H. ***Escherichia coli* shigatoxigênicas pertencentes aos sorogrupos O157, O111 e O113, detectadas em fezes de bovinos, água e leite de propriedades leiteiras.** 2003. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; JOHNSON, R. P.; ODORICO, V. G.; ALVES, D.; RAHN, K.; WILSON, J. B.; WELCH, M. K.; KHAKHRIA, R. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. **Epidemiol Infect.** V.120, p.17-20, 1998.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci.** v. 87, p. 7839-7843, 1990.

JEONG, S. H.; BAE, I. K.; KWON, S. B.; LEE, J. H.; SONG, J. S.; JUNG, H. I.; SUNG, K. H.; JANG, S. H.; LEE, S. H. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* in Korea. **J. Appl. Microbiol.** n.98, p.921-927, 2005.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin Microbiol Rev.** Washington, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

JOHNSON, M. W.; FITZGERALD, M. W.; WELTER, M. W.; WELTER, C. J. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. **Vet Med.** V.87, p. 382-386, 1992.

JOHNSON, R. P.; CLARKE, R. C.; WILSON, J. B.; JEFFERY, B.; READ, S. C.; RAHN, K.; RENWICK, S. A.; SANDHU, K. A.; ALVES, D.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; MCEWEN, S. A.; SPIKA, J.; GYLES, C. L. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **J Food Protec.** Ames, v.59, p.1112-1122, 1996.

JORDAN, D.; McEWEN, S. A.; LAMMERDING, A. M.; McNAB, W. B.; WILSON, J. B. Pre-slaughter control of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a simulation study. **Prev Vet Med.** V.41, p.55-74, 1999.

KADDU-MULINDWA, D. H.; AISU, T.; GLEIER, K.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda. **In J Food Microbiol.** V.66, p.95-101, 2001.

KAPER, J. B.; RODRIGUES, J.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; TRABULSI, L. R. Proceedings of the international Symposium on enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Microbiol Rev.** Washington, v.27, sup.1, 1995.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev Microbiol.** São Paulo, v.27, p.130-133, 1996.

KARAOULIS, D. K. L.; BOEDEKER, E. C. Populations Genetics and Pathogenesis of Infection. In: MACKIE, R. I.; WITH, B. A.; ISAACSON, R. E. (Ed.). *Gastrointestinal Microbiology*. Ed. Chapman and Hall, 1997, p. 627.

KARCH, H.; FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L. Nucleotide sequence analyses of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J Clin Microbiol.** Washington, v.32, n.10, p.2460-2463, 1994.

KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P. C.; STEELE, B. T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. **Lancet.** Baltimore, v.2, p.1299-1300, 1983.

KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.** Washington, v. 2, p. 15-38, 1989.

KENNE, W. E.; McANULTY, J. M.; HOESLY, F. C. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **N Engl J Med.** V.331, p.579-584, 1994.

KEENE, W. E.; HEDBERG, K.; HERRIOTT, D. E.; HANCOCK, D. D.; MCKAY, R. W.; BARRETT, T. J.; FLEMING, D. W. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by raw milk. **J Infect Dis.** Chicago, v.176, p. 815-818, 1997.

KENSCH, G. T.; ACHECON, D. W. K. Patógenos bacterianos Entéricos Invasivos e Causadores de Dano Tecidual: Diarréia Sanguinolenta e Desinteria. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia de Doenças Infecciosas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.161-171.

KESKIMAKI, M.; MATTILA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag Microbiol Infect Dis**. n.40, p. 151-156, 2001.

KIERS, J. L., NOUT, M. J. R., ROMBOUTS, F. M., NABUURS, M. J. A., VAN DER MEULEN, J. (2002) Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Lett Appl Microbiol**. n.35, 311-315, 2002.

KIRK, J. H.; PRICE, S.; WRIGHT, J. C. *Escherichia coli* O157:H7 in milk. **Large Anim Pract**. London, v.18, n.2, p.16-19, 1997.

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

KOBAYASHI, H.; SHIMADA, J.; NAKAZAWA, M.; MOROZUMI, T.; POHJANVIRTA, T.; PELKONEN, S.; YAMAMOTO, K. Prevalence and Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Appl Env Microbiol**. V.67, n.1, p.484-489, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Diagnóstico Microbiológico. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 177-261.

LATHI, E.; KESKIMAKI, M.; RANTALA, L.; HYVONEN, P.; SIITONEN, A.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle. **Vet Microbiol**. V.79, p.239-251, 2001.

LATHI, E.; EKLUND, M.; RUUTU, P.; SIITONRN, A.; RANTALA, L.; NUORTI, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** Wiesbaden, n.21, p.189-195, 2002.

LAW, D.; KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga like toxin producing *E. coli* serogroups. **Infect Immun**. Washington, v. 63, p. 700-702, 1995.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **J Appl Microbiol**. Oxford, v.88, p.729-745, 2000.

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

LEOTTA, G. A.; DEZA, N.; ORIGLIA, J.; TOMA, C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; IYODA, S.; SOSA-ESTANI, S.; RIVAS, M. Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. **Vet Microbiol**. V.118, p.151-157, 2006.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiol Rev**. v.6, p. 31-51, 1984.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J Infect Dis**. Chicago, V.156, p.175-182, 1987.

LEUNG, K. T.; MACKERETH, R.; TIEN, Y.; TOPP, E. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. **FEMS Microbiol Ecol.** n. 47, p.111-119, 2004.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International. Wallingford, p.3-72, 1994.

LIPMAN, L. J. A.; NIJS, A.; LAM, T. J. G. M.; GAASTRA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Vet Microbiol.** n. 43, p.13-19, 1995.

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

LIU, P.; LAU, Y.; HU, B. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. **J Clin Microbiol.** n.33, p.1779-1783, 1995.

LONG, K. Z.; WOOD, J. W.; GARIBY, E. V.; WEISS, K. M.; MATHEWSON, J. J.; DE LA CABADA, F. J.; DUPONT, H. L.; WILSON, R. A. Proportional hazards analysis of diarrhea due to enterotoxigenic *E. coli* and breast feeding in a cohort of urban Mexican children. **Am J Epidemiol.** V.139, p.193-205, 1994.

LOPES-SAUCEDO, C.; CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUES, F. R.; TORRES, J.; TARR, P. L.; ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.** V.9, p.127-131, 2006.

McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Mol Microbiol.** V.23, p.399-407, 1997.

MARTIN, M. L.; SHIPMAN, L. D.; WELLS, J. G.; POTTER, M. E.; HEDBERG, K.; WACHSMUTH, I. K.; TAUXE, R. V.; DAVIS, J. P.; ARNOLDI, J.; TILLELI, J. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uremic syndrome. **Lancet.** Baltimore, v.2, p.1043, 1986.

MASSA, S., ALTIERI, C., QUARANTA, V., DE PACE, R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. **Lett Appl Microbiol.** 24, 347-350, 1997.

MATTHEWS, K. R.; MURDOUGH, P. A.; BRAMLEY, A. J. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **J Appl Bacteriol.** Oxford, v.82, n.2, p.197-203, 1997.

MAURER, J. J.; LEE, M. D.; LOBSINGER, C.; BROWN, T.; MAIER, M.; THAYER, S. G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* strains isolated by random amplification of polymorphic DNA. **Avian Dis.** N.42, p.431-451, 1998.

MELLIES, J. L.; ELLIOT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol Microbiol.** V.33, p.296-306, 1999.

MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRE, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLEMI, G.; GUTH, B. E. C.3 MASANA, M. O.; CATALDI, A.; RODRIGUES, H. R.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. **Inter J Food Microbiol.** V.96, p.189-198, 2004.

MIDGLEY, J., FEGAN, N., DESMARCHELIER, P. Dynamics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in feedlot cattle. **Lett Appl Microbiol.** 29, 85-89, 1999.

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

MORGAN, D.; NEWMAN, C. P.; HUTCHINSON, D. N.; WALKER, A. M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin Producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. **Epidemiol Infect.** Cambridge, v.111, p.181-187, 1993.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.** Washington, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NATARO, J. P.; LEVINE, M. M. *Escherichia coli* diseases in humans. In: GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford: CAB International, 1994, p.285-333.

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

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

ORDEN, J. A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; CID, D.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; DE LA FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. **Vet Microbiol.** V. 63, p. 239-248, 1998.

OSEK, J.; GALLIEN, P.; PROTZ, D. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. **Comp Immun Microbiol Infect Dis.** Oxford, n.23, p.267-276, 2000.

OSTROFF, S. M.; KOBAYASHI, J. M.; LEWIS, J. H. Infection with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. **J Amer Med Assoc.** V. 262, p. 355-359, 1989.

OSTROFF, S. M.; Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections. **J Infect Dis.** Chicago, v. 160, p. 994-999, 1989.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb_{o111} and rfb_{o157}. **J Clin Microbiol.** Washington, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli*. Strains Belonging to serogroups O111, O157 and O113 by Multiplex PCR. **J Clin Microbiol.** Washington, v. 37, n. 10, p. 3362-3365, 1999.

PATON, A. W.; RATCLIFF, R. M.; DOYLE, R. M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANSER, J. A.; PATON, J. C. Molecular Microbiological Investigation of an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Caused by Dry Fermented Sausage Contaminated with Shiga-like Toxin-Producing *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol.** Washington, v.34, n.7, p.1622-1627, 1996.

PENTEADO, A. S.; UGRINOVICH, L. A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; ANDRADE, J. R. C.; CORREA, S. S.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. **Vet Microbiol.** v.89, n. 1, p. 41-51, 2002.

PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; COKER, C.; HOLMES, R. K. Cloning, nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. **J Bact.** V. 171, p.4945-4952, 1989.

PIGATTO, C. P. SCHOKEN-ITURRINO, R. P., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., COMARELLA, L., IRINO, K., KATO, M. A. M. F., FARAH, S. M. S. S., WARTH, J. F., FADEL-PICHET, C. M. T. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. **Can J Microbiol.** 54, 588-593, 2008.

PIVA, I. C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIULIANO, L. G. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J Clin Microbiol.** V.41, n.5, p.1827-1832, 2003.

PRATA, L. F. Manual de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (Tradução e complementação editorial) "Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins" Funep. Jaboticabal, p. 27-29, 1999.

PRÈRE, M. F.; BACRIE, S. C.; BARON, O.; FAYET, O. Bacterial etiology of diarrhea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. **Pathologie Biologie.** V. 54, p. 600-602, 2006.

RAMCHANDANI, M.; MANGES, A. R.; DEBROY, C.; SMITH, S. P.; JOHNSON, J. R.; RILEY, L.W. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *E. coli*. **Clin Infect Dis.** n.40, p.251-257, 2005.

RASRINAUL. L., SUTHIENKUL, O., ECHEVERRIA, P.D. Foods as source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. **Amer J Trop Med Hyg**, v.39, p.97-102, 1988.

REITSMA, C. J.; HENNING, D. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar chesse. **J Food Prot.** Ames, v.59, p.460-464, 1996.

RIBEIRO, M. G.; PINTO, J. P. A. N.; SILVA, E. O. T. R. *Escherichia coli* O157:H7. De hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. **Hig Alimen.** V.13, n.66-67, p.88-99, 1999.

RICE, D. H.; HANCOCK, D. D.; VETTER, R. L.; BESSER, T. E. *Escherichia coli* O157 infection in a human linked to exposure to infected livestock. **Vet Rec.** v.138, p.311, 1996.

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

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; McGee, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; CHOEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New Eng J Med.** London, v.308, n.12, p.681-685, 1983.

RILEY, L. W.; GUNZBURG, S. T.; TORNIEPORTH, N. G. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the Bundle-forming Pilus gene. **J Clin Microbiol.** Washington, v.33, n.5, p.1375-1377, 1995.

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

SANZ, M.; VINAS, M. R.; PARMA, A. E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. **Euro J Epidemiol.** Rome, v.14, p.399-403, 1998.

SARGEANT, J. M.; SANDERSON, M. W.; SMITH, R. A.; GRIFFIN, D. D. *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle feces and water in four major feeder-cattle states in the USA. **Prev Vet Med.** Amsterdam, v.61, p.127-135, 2003.

SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L. B.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; RILEY, L.; FAGUNDES-NETO, U. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of *Escherichia coli* isolated from stools of children in northeastern Brazil. **Braz J Microbiol.** V. 32, p. 313-319, 2001.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev.** v. 60, p.167-215, 1996.

SERIWATANA, J., ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D.N., *et al.* Type II enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. **Infect Immun,** v.56, p.1158-1161, 1988.

SHERE, J. A.; BARTLETT, K. J.; KASPAR, C. W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. **Appl Environ Microbiol.** Washington, v.64, n.4, p.1390-1399, 1998.

SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNERIOL, L. A.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *E. coli* in pasteurized milk in Brazil. **Rev Saúde Pública.** São Paulo, v.35, n.4, p.375-379, 2001.

SILVEIRA, W. D.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; BARBOSA, I. A. G. C. D. LEITE, D. S.; CASTRO, A. F. P.; BROCCCHI, M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Vet Microbiol.** n. 89, p.323-328, 2002.

SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S.; KONOWALCHUK, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells. **Infect Immun.** Washington, v.16, n.2, p. 617-622, 1977.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRON, J. A.; KAPER, J. B. Quorum Sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Bacteriol.** Washington, v.183, n.17, p.5187-5197, 2001.

STAMM, I.; WUHRER, M.; GEYER, R.; BALJER, G.; MENGE, C. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin1. **Microbial Pathogen.** N.33, p.251-264, 2002.

SUSSMAN, M. Escherichia coli in human and animal disease. The virulence of *Escherichia coli*. Oxford: Academic, 1985. p. 7-45.

TESH, V. I.; O'BRIAN, A. D. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga like toxins. **Mol Microbiol.** Oxford, v. 5, p. 1817-1822, 1991.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GOMES, M. J. P.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Vet Microbiol.** V. 119, p. 358-365, 2007.

UGRINOVICH, L. A.; ÁVILA, F. A.; OLIVEIRA, M. N.; CASTRO, A. F. P. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. **Ciência Rural.** V.32, n.2, p.289-291, 2002.

UPTON, P.; COYA, J. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply. **Lancet.**, v.344, p.1015, 1994.

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

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, A. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J Clin Microb.** V. 42, n. 2, p. 903-905, 2004.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acid Res.** N.19, p.6823-6831, 1991.

VOLD, L.; JOHANSEN, B. K.; KRUSE, H.; SKJERVE, E.; WASTESON, Y. Occurrence of shigatoxigenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. **Epidemiol Infect.** V.120, p.21-28, 1998.

WALDOR, M. K. Bacteriophage biology and bacterial virulence. **Trends Microbiol.** V.6, p.295-297, 1998.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Appl Environ Microbiol.** V.62, n.7, p.2567-2570, 1996&

WANI, S. A.; BHAT, M. A.; SAMANTA, I.; NISHIKAWA, Y.; BUCHH, A. S. *Escherichia coli* O4: NM associated with an outbreak of calf diarrhea. **Vet J.** V.169, p.300-302, 2005.

WARRINER, K.; ALDSWORTH, T. G.; KAUR, S.; DODD, C. E. R. Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. **J Appl Microbiol.** n.93, p.169-177, 2002.

WASTESON, Y. Zoonotic *Escherichia coli*. **Acta Vet Scand.** Vanlose, n.95, p.79-84, 2001.

WEINSTEIN, D. L.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. **Infect Immun.** Washington, v. 56, p. 106-111, 1988.

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

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M. H.; ANNUNOU, A.; TSCHAPE, H. Strong Association Between Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx*₂ and *eae* as possible explanation for predominance of serogroups O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** n.22, p.726-730, 2003.

WIECZOREK, K.; KOWALCZYK, A.; OSEK, J. Relationships between phenotype and genotype of *Escherichia coli* O149:K91, F4 strains isolated from pigs with diarrhoea. **Bull Vet Inst Pulawy.** V. 48, p.219-223, 2004.

WIELER, L. H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. **J Clin Microbiol.** V.34, n.12, p.2980-2984, 1996.

WIELER, L. H.; SCHWANITZ, A.; VIELER, E.; BUSSE, B.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J. B.; BALJER, G. Virulence and properties of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) stains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. **J Clin Microbiol.** V.36, n.6, p.1604-1607, 1998.

WILSON, J. B.; CLARKE, R. C.; RENWICK, S. A.; RAHN, K.; JOHNSON, R. P.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; ALVES, D.; GYLES, C. L.; SANDHU, K. S.; MCEWEN, S. A.; SPIKA, J. S. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. **J Infect Dis.** Chicago, v.174, p.1021-1027, 1996.

WILSON, J. B.; CLARKE, R. C.; RENWICK, S. A.; RAHN, K.; JOHNSON, R. P.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; ALVES, D.; MCEWEN, S. A.; SPIKA, J. S.; ELLIS, A. G. Risk factors for infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle on Ontario dairy farms. **Prev Vet Med.** v.34, p.227-236, 1998.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Mol Biol Evol.** n. 23, v.6, p.1156-1168, 2006.

YU, J.; KAPER, J. B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol Microbiol.** Oxford, n.6, p.411-416, 1992.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; SHERE, J.; GARBER, L. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Appl Environ Microbiol.** Washington, n.61, p.1290-1293, 1995.

ZHU, C.; HAREL, J.; JACQUES, M.; DESAUTELS, C.; DONNENBERG, M. S.; BEAUDRY, M.; FAIRBROTHER, J. M. Virulence properties and attaching-effacing of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. **Infect Immun.** V. 62, p.4153-4159, 1994.