

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

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA  
(STEC) E ENTEROPATOGENICA (EPEC) ISOLADAS DE  
BÚFALOS LEITEIROS NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

**Livia Gerbasi Beraldo**

Biomédica

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

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

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA  
(STEC) E ENTEROPATOGENICA (EPEC) ISOLADAS DE  
BÚFALOS LEITEIROS NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

**Livia Gerbasi Beraldo**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila**

**Co-orientador: Everlon Cid Rigobelo**

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Fevereiro de 2011**

Beraldo, Livia Gerbasi  
**B482d** Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) isoladas de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo. -- Jaboticabal, 2011  
vi, 37f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011  
Orientador: Fernando Antônio de Ávila  
Banca examinadora: José Moacir Marin, Antonio José Piantino Ferreira  
Bibliografia

1. Búfalos. 2. Microbiologia. 3. Saúde Pública. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU **614.3:636.293**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LÍVIA GERBASI BERALDO** - nascida a 21 de maio de 1986 em Jaboticabal-SP. Concluiu o Segundo Grau na Escola Estadual Aurélio Arrôbas Martins em 2003. Iniciou o curso de Biomedicina, no ano de 2005, no Centro Universitário de Araraquara, concluindo em janeiro de 2009. Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária.

*Dedico,*

*a Deus, que está acima de todas as coisas,*

*a meus queridos pais Izabel e Sérgio e minha irmã querida Aline que sempre me incentivaram a seguir em frente, dando força e auxiliando sempre, e que me ensinaram a tornar-me uma pessoa de boas e sólidas convicções.*

*Amo muito vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

Especialmente meus pais Sérgio Aparecido Beraldo e Izabel Cristina Gerbasi Beraldo, minha querida irmã Aline Gerbasi Beraldo pelo incentivo, confiança e apoio durante todo o trabalho.

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

Ao Co-orientador Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo pelo apoio e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Veterinária, Clarissa Araújo Borges e Renato P. Maluta pelo auxílio e companheirismo em todos os momentos.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia Veterinária, João L. Quintana, e a secretária do departamento de Microbiologia Edna M. T. Daquila pelo auxílio em todos os momentos.

As amigas de mestrado Marita Vedovelli Cardozo e Vanessa Sayuri Sato.

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

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÕES.....	26
8. REFERÊNCIAS.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>0</sup>C – Graus Celsius

BFP- Fator de aderência denominado “Bundle forming pili”

CH - Colite hemorrágica

eae - “Attaching and effacing”

EAF - Plasmídeo de EPEC típica

Efa 1 - Fator de aderência de EHEC

Ehx - Hemolisina de EHEC

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

Iha - Adesina homóloga a IrgA de *Vibrio cholerae*

LEE - *Locus of enterocyte effacement*

LPF - Fímbria polar longa

μL - Microlitro

mL - Mililitro

mM - Milimolar

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

VT - Verotoxina

SHU - Síndrome hemolítica urêmica

STEC ou VTEC - *Escherichia coli* produtora de toxina shiga

Saa - Adesina autoaglutinante de STEC

Stx - Toxina Shiga

TEB - Solução tampão Tris-EDTA-Borato

UV - Ultra-violeta

V - Volt



## LISTA DE TABELAS

1. Distribuição do número de amostras por fazendas.....	12
2-“ Primers” utilizados na PCR para amplificar fragmentos específicos dos genes codificadores de fatores de virulência dos isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo.....	14
3- Genótipos dos isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo.....	17
4- Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 23 estirpes de <i>E. coli</i> que apresentaram genes de virulência isoladas de três fazendas de búfalas leiteiras da região de Ribeirão Preto-SP no período de março a julho de 2010.....	20

**LISTA DE FIGURAS**

- 1- Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene *lpfA*<sub>O113</sub> em isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo ..... 19
- 2- Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene *ehxA* em isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo ..... 19

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* SHIGATOXIGÊNICA (STEC) E  
ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE BÚFALOS LEITEIROS NO  
ESTADO DE SÃO PAULO.**

**RESUMO** - *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) estão implicadas em causar sérias doenças no homem. Devido o crescimento da produção de búfalos leiteiros e a pequena quantidade de estudos sobre a prevalência de STEC e EPEC em bubalinos esse trabalho foi proposto. Os objetivos foram: determinar a prevalência de STEC e EPEC de amostras de origem bubalina através da pesquisa dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *iha*, *efa1*, *toxB*, *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub>, *saa*, *ehxA* e *bfp*; caracterização bioquímica e sorogrupagem dos isolados e o perfil de resistência das estirpes de STEC e EPEC isoladas frente a diferentes drogas antimicrobianas. Foram isoladas 33 estirpes de *E. coli*, das quais 21 (63,6%) STEC e 12 (36,4%) EPEC, que apresentaram 23 perfis genéticos diferentes. Todos os isolados apresentaram mais de um gene de virulência. De todos os genes estudados apenas o *bfp* não foi encontrado nas amostras analisadas. As estirpes isoladas apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados. O sorogrupo mais freqüente foi o O26, seguido do O157. As estirpes estudadas apresentaram genes de virulência que estão relacionados à graves doenças no homem. Pelos resultados pode-se dizer que búfalos são importantes reservatórios de STEC e EPEC e a presença desses isolados com determinados perfis genéticos devem ser melhor estudados.

Palavras-chave: Búfalo, EPEC, genes de virulência, STEC.

**DETECTION of *Escherichia coli* SHIGA TOXIN (STEC) AND  
ENTEROPATHOGENIC (EPEC) ISOLATED FROM DAIRY BUFFALO THE  
STATE OF SAO PAULO.**

**ABSTRACT** - *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) are implicated in causing serious disease in humans. Due to the increased production of buffalo milk and small amount of studies on the prevalence of STEC and EPEC in buffalo this work was proposed. The objectives were to determine the prevalence of STEC and EPEC isolates from buffalo by investigating the genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *iha*, *efa1*, *toxB*, *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub>, *saa*, *ehxA* and *bfp*; sorogrupagem and biochemical characterization of isolates and resistance profile of strains of EPEC and STEC isolates to different antimicrobial drugs. We isolated 33 strains of *E. coli*, of which 21 (63.6%) STEC and 12 (36.4%) EPEC, showed that 23 different genetic profiles. All isolates had more than one virulence gene. All of the genes studied only the *bfp* was not found in the samples. The strains isolated were sensitive to most antimicrobials tested. The serogroup O26 was the most common, followed by O157. The strains were virulence genes that are related to severe disease in humans. From the results we can say that buffaloes are major reservoirs of STEC and EPEC and the presence of strains with certain genetic profiles should be better studied.

Keywords: Buffalo, EPEC, virulence genes, STEC.

## I. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* pertence ao gênero *Escherichia*, que contém a maioria dos bacilos móveis Gram negativos da família *Enterobacteriaceae* (NATAO & KAPER, 1998). É a espécie de bactéria mais comumente isolada de espécimes clínicos associada às doenças infecciosas, envolvendo virtualmente todos os tecidos e sistemas orgânicos e animais.

*Escherichia coli* é um microrganismo que coloniza tipicamente o trato intestinal infantil dentro de poucas horas de vida, e, dali em diante, *E. coli* e o hospedeiro obtém benefícios mútuos, como a fabricação de vitamina K e B. *E. coli* permanece inofensivamente confinada na luz do intestino grosso, contudo um hospedeiro debilitado, imunossuprimido ou quando as barreiras gastrintestinais são violadas, as cepas de *E. coli* podem causar infecção.

*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).

*Escherichia coli* produtora da toxina shiga (STEC) pertence a um importante e emergente grupo de patógenos, e são associados com um largo espectro de doenças em humanos, incluindo diarreia, colites hemorrágicas e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) em todo mundo. Ainda não se conhece uma lista completa de determinantes de virulência para STEC e EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) causadoras de doenças. Porém, a toxina Shiga é um fator chave em patogenicidade.

Outro importante grupo dessa bactéria, identificado como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) pode causar diarreia severa, principalmente em crianças e neonatos em países em desenvolvimento.

Os ruminantes domésticos, especialmente bovinos e ovinos, têm sido considerados os principais reservatórios de STEC e EPEC causadoras de infecções em humanos, porém já se sabe que essas bactérias também podem estar presentes no

trato intestinal de outros ruminantes, como búfalos, cabras e veados. A transmissão ocorre com o consumo de alimentos mal cozidos, produtos lácteos não pasteurizados, água ou vegetais contaminados por fezes, contendo cepas de STEC e EPEC.

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

## II. REVISÃO DE LITERATURA

As principais categorias diarreio gênicas de *E. coli* são: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enteroagregativa (EAEC), difusamente aderente (DAEC) e produtora de toxina Shiga (STEC). Linhagens pertencentes a cada categoria utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, conseqüência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade, além da presença de bacteriófagos (PATON & PATON, 1998).

*E. coli* enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* Shigatoxigênicas (STEC) representam um importante grupo de patógenos de interesse em saúde pública (OLIVEIRA et al., 2007).

*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é um patógeno emergente capaz de causar colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em humanos, e representa um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Os sintomas da colite hemorrágica iniciam-se com uma fase que consiste em cólicas abdominais intensas seguidas por um ou dois dias de diarreia aquosa abundante, que progride para sanguinolenta, com presença de coágulos, não acompanhada de leucócitos nas fezes, manifestando-se em pacientes sem febre. A doença, geralmente, é autolimitante, durando em média oito dias (FDA, 1999). Essas características a distinguem da disenteria clássica causada por *Shigella sp.* ou *E. coli* enteroinvasiva, que são caracterizadas por febre alta, toxemia, fezes com pouco sangue e muco contendo muitos leucócitos (DUPONT et al., 1971). Em uma parte dos pacientes a infecção por STEC progride para síndrome hemolítica urêmica que afeta principalmente crianças, sendo neste grupo a mais importante causa de falência renal (DOYLE et al., 1995). A síndrome é definida por um início súbito de anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda após o aparecimento de sintomas no trato respiratório superior, estômago ou intestinos (FONG et al., 1982, KARMALI et al., 1985). O mecanismo de patogenicidade das STEC é complexo e envolve vários fatores de virulência. A maior parte da patogênese é atribuída ao efeito sistêmico das

Shigatoxinas, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese protéica em células do endotélio microvascular (NATARO & KAPER, 1998, PATON & PATON, 1998). O dano que essas toxinas provocam nestas células ativa a coagulação intravascular que conduz às principais manifestações de SHU (TARR et al., 2005).

STEC são definidas pela produção de um ou mais tipos de toxina shiga (Stx1, Stx2), estas toxinas são antigenicamente relacionadas com a citotoxina (toxina shiga) produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1 (AGBODAZE, 1999). Stx1 diverge da Stx2 na seqüência de aminoácidos da subunidade B alterando, desta forma, a afinidade pelo receptor celular (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998). As características da família das toxinas Shiga estão resumidas a seguir:

- A estrutura da proteína è constituída de um polipeptídio A e cinco polipeptídios B;
- O receptor na célula eucariótica e o glicolípídeo Gb3 ou Gb4 (Stx2e);
- O modo de ação consiste na inibição da síntese protéica em célula eucariótica;
- Citotóxica para células Vero, HeLa e células endoteliais;
- Stx1 e Stx2 não apresentam reação cruzada;
- Os aminoácidos idênticos entre Stx1 e Stx2 são de aproximadamente 55%;
- Stx2 e mais tóxica para as células endoteliais microvascular renal humana do que a Stx1 (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998).

O gene *stx*, que codifica a toxina, esta localizado no genoma de bacteriófagos integrando-se ao cromossomo da célula hospedeira (GOBIUS et al.,2003). A presença desses genes em bacteriófagos propicia não somente a capacidade de disseminação entre diferentes cepas, mas também possibilita a presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. Portanto, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* (FURST et al., 2000). O padrão de produção de toxinas em STEC isoladas de infecções humanas parece ser semelhante ao de STEC isoladas de bovinos saudáveis (OSEK, 2000).

A patogenicidade de STEC está associada a sua capacidade de produzir toxina Shiga-like e aderir à mucosa intestinal (BARRETT et al., 1992). Estudos epidemiológicos indicam que as cepas de STEC que produzem somente Stx2 estão



mais comumente associadas a doenças graves em seres humanos do que aquelas que produzem somente Stx1 ou Stx1 e Stx2 (OSTROFF et al., 1989). Uma possível explicação para este fato é que o nível de transcrição do gene *stx2*, que codifica a toxina Stx2, “in vivo”, é maior que o do *stx1* (WEINSTEIN et al., 1988).

Outro gene de virulência associado a produção de doença em humanos é o gene *eae* que codifica a intimina requerida para o ataque a mucosa intestinal, produzindo uma lesão do tipo “attaching and effacing”.

Estudos epidemiológicos têm revelado que, independentemente do sorogrupo, é a presença dos genes que codificam para a toxina Shiga-like 2 (*stx2*) e intimina (*eae*) que está associada a doença severa (WERBER et al., 2003).

O consumo de carne ou leite cru tem sido relatado como fontes prováveis de infecção em diversos surtos os quais têm ocorrido, principalmente, no Canadá, USA e no Reino Unido (BLANCO et al., 1996). ALLERBERGER et al. (2001) relataram 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) sugerem 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. Entretanto, uma grande variedade de alimentos está relacionada a doenças causadas por esses microrganismos, como frutas, vegetais, produtos secos ou fermentados, derivados de leite crus ou pasteurizados inadequadamente.

Os hospedeiros naturais de STEC são animais silvestres e domésticos principalmente os bovinos (GRIFFIN & TAUXE, 1991). *E. coli* produtoras de toxina shiga-like podem estar presente na microbiota intestinal de uma grande variedade de animais incluindo bovinos, ovinos, bubalinos, 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%. STEC são isoladas usualmente de animais saudáveis (TRISTÃO et al., 2007). Estudo realizado por

OLIVEIRA et al. (2007) revelaram que rebanhos bubalinos possuem altas taxas de STEC.

Outra importante categoria de *E. coli* é a enteropatogênica (EPEC), que pode causar diarreia severa, principalmente em crianças e neonatos em países em desenvolvimento NATARO & KAPER (1998). EPEC são definidas pela presença do 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 do epitélio intestinal. Os fatores necessários para o desenvolvimento da lesão A/E são codificados por uma ilha de patogenicidade cromossômica, de aproximadamente 35 Kb, conhecida como *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). 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) através do gene *bfp* (KAPER et al., 1995). Linhagens que possuem o plasmídeo EAF são chamadas de EPEC típicas e as que não possuem este plasmídeo são chamadas de EPEC atípicas. 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 & KAPER, 1998).

A síndrome causada por EPEC 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 & LEVINE, 1994).

Estudos realizados em países em desenvolvimento como Brasil têm demonstrado que de 30 a 40% das diarreias infantis pode ser atribuída as EPEC, e a incidência de infecção por EPEC pode exceder a infecção por rotavírus (GOMES et al., 1991). Infecções causadas por linhagens EPEC têm sido relatadas principalmente em crianças de até dois anos de idade, entretanto surtos graves de diarreia em adultos também têm sido relatados (HEDBERG et al., 1997).

EPEC pode causar sérios surtos de infecção diarreica, principalmente em crianças (PRÈRE et al., 2006), uma vez que já foram isoladas de alimentos e produtos lácteos (SILVA, 2001), evidenciando ainda mais o perigo à saúde pública.

Além desses genes de virulência STEC e EPEC podem possuir outros, como o gene *ehxA*, que codifica uma hemolisina responsável pela formação de poros nas células eucarióticas, os genes *iha*, *efa1*, *toxB*, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub> e *saa* que codificam adesinas (McDANIEL et al., 1995; TOMA et al., 2004; BIEBER et al., 1998).

A enterohemolisina, codificada pelo gene *ehxA* pode estar presente em STEC e em EPEC. Sua produção está, geralmente, associada ao plasmídeo pO157, mas os genes da enterohemolisina também podem ser encontrados em outros plasmídeos de alta massa molecular (BRUNDER et al., 1999). A enterohemolisina é uma proteína monomérica que se insere na membrana plasmática das células eucarióticas e forma poros (SCHMIDT et al., 1999). O provável papel da enterohemolisina na patogênese da CH e da SHU ainda é incerto. Uma alternativa seria que a hemoglobina liberada pela ação da enterohemolisina provê uma fonte de ferro que favoreça a multiplicação da bactéria no intestino (LAW & KELLY, 1995).

A adesina Saa, codificada pelo gene *saa* foi identificada pela primeira vez por PATON et al. (2001), em STEC O113:H21 isolada de um surto de SHU. Essa cepa não possui a ilha de patogenicidade LEE que contém o gene *eae*, o que sugere que Saa possa ser um fator de virulência em STEC e EPEC LEE-negativa isoladas de humanos (PATON & PATON, 2002). Existem evidências que o gene *saa*, que codifica esta adesina, esteja associado com o gene que codifica enterohemolisina (PATON et al., 2001). O gene *saa* foi localizado em um megaplasmídeo, cuja eliminação resultou na redução da capacidade de aderência da bactéria ao intestino do hospedeiro (JENKINS et al., 2003).

Várias proteínas foram propostas por serem novos fatores de adesão; isto inclui ToxB (uma proteína identificada no plasmídeo pO157 e requerida para expressão de aderência de O157:H7), que é produzida pelo gene *toxB*; Iha (proteína que confere aderência similar ao *Vibrio cholerae*) produzida pelo gene *iha*; Efa1 (fator de aderência de EHEC) produzida pelo gene *efa1*; LPF (long polar fimbriae). Essas adesinas putativas também são encontradas em um grande plasmídeo carregado por cepas de STEC ou em um único seguimento de DNA de *E. coli* EDL933 chamado de ilha O. ToxB

e Saa são encontrados em plasmídeos, e uma associação entre a presença do gene *saa* e do gene *ehxA* foi observada por PATON & PATON (2001). Efa1 foi recentemente associado com sorotipos de STEC que estão ligadas a sérias doenças no homem. LPF OI-141 e LPF OI-154 estão presentes em cepas de O157:H7 e foram relatadas por ter papel de aderência. Alguns autores sugerem que LPF O113 funciona como uma adesina em cepas LEE-negativas (TOMA et al., 2004).

Diferentes antígenos podem ser encontrados na superfície bacteriana. Os três antígenos fundamentais para os ensaios sorológicos são O, K e H (ORSKOV & ORSKOV, 1984; MENG et al., 2001). Os antígenos somáticos “O”, termoestáveis, são relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares “H”, termolábeis, são relacionados com proteínas dos flagelos e os antígenos capsulares “K”, são relacionados com polissacarídeos capsulares (MENG et al., 2001).

Embora mais de 400 sorotipos de *E. coli* produzam a toxina Shiga, aproximadamente 200 foram descritos como causa de infecções enterohemorrágicas, no ser humano. O sorotipo O157:H7 é o predominante entre STEC nos Estados Unidos e o mais freqüentemente associado a surtos de origem alimentar nesse país (VOLD et al., 1998). A habilidade para distinguir estes isolados sorologicamente é importante para esclarecer quais tipos de *E. coli* podem causar diarreia ou outras doenças.

*Escherichia coli* patogênicas ao homem podem pertencer a diversos sorogrupos, entretanto O157, O111, O113 e O26 são os mais comumente envolvidos (HUSSEIN & SAKUMA, 2005).

Os fatores de resistência as drogas antimicrobianas são, na sua grande maioria, de natureza plasmídica. Nos finais da década de 50 e princípio da de 60, autores japoneses revelaram a existência dos plasmídeos R. A partir de então, vários outros detectaram sua presença nas enterobactérias patogênicas *Salmonella*, *E. coli* e outros microrganismos do homem e animais. Os plasmídeos R são responsáveis pelas resistências adquiridas a diversos antimicrobianos e pelo aparecimento de amostras multiresistentes. É, de maneira geral, aceito que quanto mais antibióticos usamos, mais rapidamente as bactérias irão adquirir resistência. Também tem sido aceito, que uma vez os antibióticos retirados da clínica, os genes de resistência eventualmente

desaparecerão, já que não terão mais nenhum valor de sobrevivência para a célula bacteriana. No entanto, recentes descobertas têm demonstrado que depois de um longo período de exposição aos antibióticos certas espécies bacterianas podem adaptar-se a este ambiente de tal maneira que elas mantêm estáveis seus genes de resistência mesmo depois da remoção dos antimicrobianos. Assim, existem razões para se acreditar, que uma vez a resistência desenvolvida, nem a logo prazo ela é perdida (FRANKLIN, 1999).

Na maioria dos casos, infecções por STEC e EPEC são atribuídas ao consumo de carne bovina, leite e seus produtos que foram contaminados com fezes de bovinos (HUSSEIN & SAKUME, 2005). Desse modo, búfalos leiteiros também podem ser considerados como reservatórios desses patótipos e podem significar importante risco a saúde do homem.

Os reservatórios de STEC e EPEC são animais silvestres e domésticos principalmente os bovinos (GRIFFIN e TAUXE, 1991). *E. coli* produtoras de toxina shiga podem estar presente na microbiota fecal de uma grande variedade de animais incluindo além dos bovinos, os ovinos, caprinos, suínos, felinos, cães e galinhas. Entretanto a prevalência de STEC e EPEC em búfalos tem sido pouco estudada (OLIVEIRA et al., 2007).

Devido à escassez de dados desses patógenos em búfalos leiteiros, é que se propôs a realização do presente trabalho, a fim de verificar a prevalência de STEC e EPEC em propriedades leiteiras. Assim, serão obtidas mais informações sobre a epidemiologia desses patógenos emergentes, que ajudarão em medidas de controle, baixando os riscos de infecção para o ser humano.

### III. OBJETIVOS

1. Determinar a prevalência de STEC e EPEC isoladas de fezes e leite de búfalas leiteiras do Estado de São Paulo.
2. Detectar os principais fatores de virulência das estirpes de *E. coli* (*stx1*, *stx2*, *eae*, *iha*, *efa1*, *toxB*, *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub>, *saa*, *ehxA* e *bfp*) isoladas de búfalas através da técnica da PCR
3. Identificação bioquímica e classificar sorologicamente as estirpes de *E. coli* isoladas de fezes e de leite de búfalas.;
4. Determinar o perfil de resistência das estirpes de STEC e EPEC isoladas de fezes e de leite de búfalas frente a diferentes drogas antimicrobianas.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Procedência e obtenção das amostras**

Foram selecionadas três propriedades de búfalas leiteiras do Estado de São Paulo, sendo uma no município de Dourado (A), outra em Sales de Oliveira (B), e outra em Ribeirão Preto (C).

No período de março a julho de 2010 foram coletadas 194 amostras de fezes e 62 amostras de leite, num total de 256 amostras. A distribuição do número de amostras por propriedade está na Tabela1. Após a obtenção das amostras, estas foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP em Jaboticabal.

### **Amostras de fezes e leite**

#### **Amostras de fezes**

As amostras de fezes foram colhidas, em torno de 10%, dos animais de cada uma das propriedades leiteiras, diretamente do reto dos animais, utilizando suabe estéril.

#### **Amostras de leite**

As amostras de leite (em torno de 40 mL) foram colhidas em tubos Falcon estéreis com capacidade para 50 mL, diretamente da torneira de saída da ordenhadeira mecânica.

Tabela 1: Distribuição do número de amostras por fazendas.

Fazenda	Amostras de fezes	Amostras de leite
A	81	22
B	25	15
C	88	25

### **Isolamento e identificação de *E. coli***

Para o isolamento de *E. coli* o leite foi semeado no ágar McConkey e incubado por 24h a 35° C; 1 mL da água peptonada contendo o suabe retal foi transferido para 5 mL de caldo VB que foram incubados a 35°C por 24h. Após esse período, 1mL de cada tubo contendo caldo VB foi semeado em placas contendo ágar MacConkey que foram incubados a 35°C por 24h. Após o crescimento foi feita a preparação do DNA template através da técnica de extração descrita por Keskimaki et al. (2001) com modificações. Em um ependorf com capacidade para 1,5mL foi adicionado 1mL de cultura bacteriana em caldo BHI previamente incubado overnight a 37° C. Essa cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por dois minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de PBS. Essa mistura foi novamente centrifugada, foi retirado o sobrenadante e ressuspendida em 0,5mL de água estéril. Ferveu-se por 10 minutos a 100° C, novamente centrifugado a 12.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante (que continha o DNA) foi retirado e colocado em ependorfs para armazenamento no freezer.



Foi feita a PCR multiplex de triagem, que será descrita na sessão seguinte, para detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*. As amostras positivas nesta PCR foram isoladas e testadas novamente por PCR para confirmar a presença dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

As colônias com características de *E. coli* foram submetidas a testes bioquímicos para confirmação da espécie (fermentação da lactose, produção de indol, reação de vermelho de metila e Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease e produção de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e analisadas novamente por PCR para se encontrar os genes *efa1*, *saa*, *ehxA*, *bfp*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *iha* e *toxB* e posteriormente submetidas a testes de sensibilidade a antimicrobianos.

### **PCR multiplex, duplex e simples**

A PCR multiplex foi realizada da seguinte maneira: uma alíquota de 4 µL de DNA foi acrescentada à uma mistura de 16 µL, que continha 7,0 µL de água MiliQ estéril, 2,0 µL de uma solução tampão 100 mM Tris-HCl [pH 8.8] 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 1,6 µL de MgCl<sub>2</sub>, 4µL de dNTP (2 mM), 0,8µL de cada primer (40 mM) e 0,2µL Taq DNA polimerase, obtendo um volume total de 20 µL. Os ciclos de amplificação da PCR foram feitos em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient nos seguintes tempos e temperaturas: t<sub>1</sub>: 5 min a 94°C; t<sub>2</sub>: 30 seg a 94°C; t<sub>3</sub>: 45 segundos a 50°C; t<sub>4</sub>: 1 min a 72°C (t<sub>2</sub>-t<sub>4</sub>, 25 ciclos repetidos) e t<sub>5</sub>: 7 min a 72°C. Nas PCRs simples e duplex foram usados os mesmos parâmetros mudando apenas as temperaturas de anelamento, que foram 53°C, 52°C, 39°C, 49°C, 59°C, 55°C, 47°C e 56°C, respectivamente, para a PCR duplex (*iha*, *toxB*), simples para *saa*, *lpfA*<sub>O113</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub>, *ehxA*, *efa1* e *bfp*. O produto da reação acrescentado de 5µL de carga de tintura (0,25% azul de bromofenol em 50% de solução de glicerol) e o marcador molecular 100-bp DNA Ladder (Fermentas) foram aplicados em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão TEB (Tris-base 890mM, EDTA 25mM, ácido bórico 890mM, pH 8,2) e separados por eletroforese

(70V/1h40). A imagem do gel foi registrada em um fotodocumentador Fisher Scientific e vista em um computador. Doze fatores de virulência foram pesquisados, sendo *stx1* e *stx2* as toxinas, *eae* a intimina, *ehxA* a hemolisina, *bfp* a fímbria e *iha*, *efa1*, *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub> e *saa* as adesinas putativas. A Tabela 2 mostra os primers utilizados.

Tabela 2: “Primers” utilizados na PCR para amplificar fragmentos específicos dos genes codificadores de fatores de virulência dos isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo.

Gene	Seqüência do oligonucleotídeo iniciador (Primer) (5'→3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>stx</i> <sub>1</sub>	AGAGCGATGTTACGGTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	China et al. (1996)
<i>stx</i> <sub>2</sub>	TGGGTTTTTCTTCGGTATC GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	China et al. (1996)
<i>Eae</i>	AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	570	China et al. (1996)
<i>ehxA</i>	CACACGGAGCTTATAATATTCTGTCA AATGTTATCCCATTGACATCATTGACT	340	Schmidt et al. (1995)
<i>Bfp</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300	Vidal et al. (2004)
<i>efa1</i>	GAGACTGCCAGAGAAAG GGTATTGTTGCATGTTTCAG	479	Nicholls et al. (2000)
<i>Saa</i>	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC	119	Paton & Paton (2002)

<i>lha</i>	CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC	1305	Schmidt et al. (2001)
	GTA TGG CTC TGA TGC GAT G		
<i>toxB</i>	ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A	602	Tarr, et al. (2002)
	TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C		
<i>lpfA</i> <sub>O113</sub>	ATG AAG CGT AAT ATT ATA G	573	Doughty et al (2002)
	TTA TTT CTT ATA TTC GAC		
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-141</sub>	CTG CGC ATT GCC GTA AC	412	Szalo et al (2002)
	ATT TAC AGG CGA GAT CGT G		
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-154</sub>	GCA GGT CAC CTA CAG GCG GC	525	Toma et al (2004)
	CTG CGA GTC GGC GTT AGC TG		

### Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco Kirby- Bauer modificado. Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), ácido nalidíxico (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), estreptomicina (10µg), gentamicina, (10µg), nitrofurantoína (300µg) e sulfametoxazol+trimetoprim (25µg) sendo o método descrito pelo NCCLS (2003).

### Identificação sorológica dos sorogrupos

As amostras de *E. coli* foram identificadas através da pesquisa do antígeno O (sorogrupo). A sorologia foi realizada com a técnica de aglutinação em lâmina. Os anti-soros testados foram os polivalente e monovalentes da Probac como segue:

Polivalente A: contém anticorpos para *E. coli* O26, O55, O111 e O119.

Polivalente B: contém anticorpos para *E. coli* O114, O125, O142 e O158.

Polivalente C: contém anticorpos para *E. coli* O86, O126, O127 e O128.

Monovalentes: contém anticorpos contra cada um dos sorogrupos anteriores, separadamente.

Estas mesmas estirpes foram também testadas com anti-soro específico O157.

A fim de se evitar reações cruzadas, inicialmente foram utilizados os soros polivalentes A e B, não ocorrendo aglutinação foi utilizado o soro polivalente C. Ocorrendo aglutinação com um dos polivalentes, foram realizadas as provas de aglutinação usando os monovalentes correspondentes.

## V. RESULTADOS

Os resultados demonstraram a presença de 76 (29,2%) amostras positivas do total de 256 amostras na PCR de triagem das quais 1 (1,3%) para *stx1*, 47 (61,8%) para *stx2*, 11 (14,5%) para *eae*, 1 (1,3%) para *stx1* e *eae*, 4 (5,3%) para *stx2* e *eae*, 7 (9,2%) para *stx1* e *stx2*, 5 (6,6%) para *stx1*, *stx2* e *eae*. A partir das 76 amostras positivas na PCR de triagem foram isoladas 33 (43,4%) estirpes, todas isoladas de fezes. Não foi encontrada nenhuma estirpe nas amostras de leite analisadas. Os genótipos das estirpes estão na Tabela 3.

Tabela 3: Genótipos dos isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo.

Genótipo	Quantidade	Tipo de <i>E. coli</i>
<i>stx2+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx2+saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx2+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	2	STEC
<i>stx2+ lpfA</i> <sub>O157/O1-154+lpfA</sub> <sub>O113</sub>	2	STEC
<i>stx1+stx2+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	2	STEC
<i>stx2+efa1+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx2+ehxA+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	3	STEC
<i>stx2+iha+saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx1+iha+saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC

<i>stx1+stx2+ehxA+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	2	STEC
<i>stx1+stx2+ehxA+efa1+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx1+stx2+ehxA+iha+toxB+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx1+eae+ehxA+efa1+iha+ lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx1+stx2+ehxA+iha+toxB+saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>stx1+stx2+ehxA+iha+ lpfA</i> <sub>O157/OI-154</sub> + <i>saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	STEC
<i>eae+iha+ lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	EPEC
<i>eae+saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	EPEC
<i>eae+lpfA</i> <sub>O157/OI-154</sub> + <i>saa</i>	1	EPEC
<i>eae+lpfA</i> <sub>O157/OI-154</sub> + <i>saa+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	EPEC
<i>eae+ehxA+iha+toxB+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	EPEC
<i>eae+ehxA+efa1+iha+lpfA</i> <sub>O113</sub>	1	EPEC
<i>eae+ehxA+efa1+iha+toxB+lpfA</i> <sub>O113</sub>	4	EPEC
<i>eae+ehxA+efa1+iha+toxB+saa+ lpfA</i> <sub>O157/OI-141</sub>	2	EPEC

---

Nenhum dos isolados continha os 12 genes pesquisados, porém todas apresentaram mais de um gene de virulência. O gene *bfp* não foi encontrado em nenhuma estirpe. Foram encontrados 23 perfis genéticos diferentes. As Figuras 1 e 2 mostram fotos de géis de agarose dos genes *lpfA*<sub>O113</sub> e *ehxA*, respectivamente.

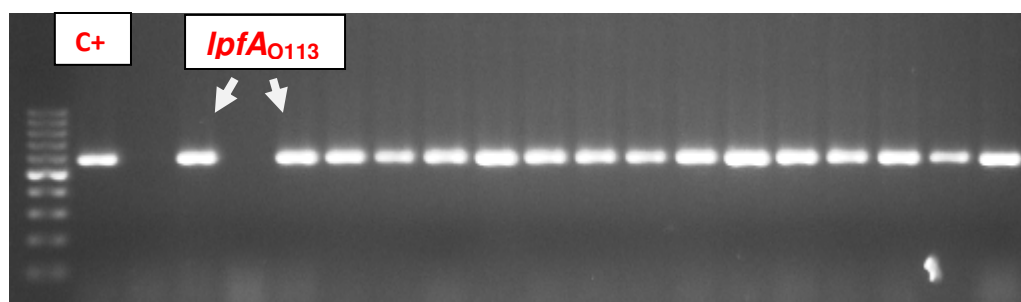


Figura 1: Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene *lpfA*<sub>O113</sub> em isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo.

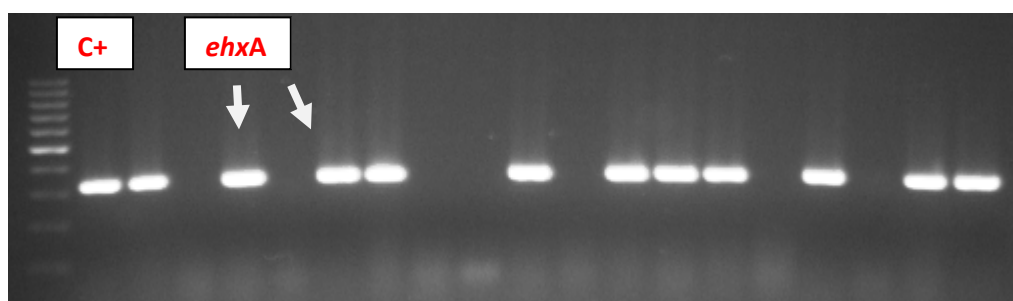


Figura 2: Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de PCR para detecção do gene *ehxA* em isolados de STEC e EPEC de búfalos leiteiros no Estado de São Paulo.

Dentre os isolados analisados, 100,0% foram sensíveis a nitrofurantoína, ciprofloxacina e gentamicina, 96,9% a sulfametoxazol+trimetoprim e ao cloranfenicol, 93,9% a ampicilina, 90,9% ao ác. Nalidixo, 84,8% a tetraciclina, 51,5% a estreptomicina. A maior resistência foi observada para a cefalotina 51,5%. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 23 estirpes de *E. coli* que apresentaram genes de virulência isoladas de três fazendas de búfalas leiteiras da região de Ribeirão Preto-SP no período de março a julho de 2010.

Antimicrobiano	Total de isolados				Total
	Sensíveis		Resistentes		
	n	%	n	%	
Ciprofloxacina	33	100,0	0	0,0	33
Gentamicina	33	100,0	0	0,0	33
Nitrofurantoina	33	100,0	0	0,0	33
Sulfametoxazol+trimetoprim	32	96,9	1	3,1	33
Cloranfenicol	32	96,9	1	3,1	33
Ampicilina	31	93,9	2	6,1	33
Ac. Nalidixo	30	90,9	3	9,1	33
Cefalotina	16	48,5	17	51,5	33
Estreptomicina	17	51,5	16	48,5	33
Tetraciclina	28	84,8	5	15,2	33

Seis estirpes apresentaram aglutinação com o soro monovalente O26, e uma aglutinou com o soro monovalente O111. Dois isolados apresentaram aglutinação com o soro para O157. Do total de 33 isolados 24 não foram sorotipados por não apresentarem aglutinação com os anti-soros testados.



## VI. DISCUSSÃO

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

*E. coli* shigatoxigênicas (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) estão entre as mais importantes causas de doença gastrointestinal em seres humanos, particularmente porque STEC pode resultar em casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU). BANATVALA et al., (2001), realizando um estudo prospectivo dos casos de SHU nos EUA, concluíram que 72,0% dos casos no país eram devidos a STEC.

No presente estudo não foi isolado nenhuma estirpe de STEC nem de EPEC nas amostras de leite analisadas. Todos os isolados são provenientes de fezes.

No presente estudo a frequência geral de STEC foi de 63,6%, enquanto a de EPEC foi de 36,4%. STEC tem sido descrita em vários países, sendo que alguns autores relatam frequências maiores e outros menores que as obtidas neste trabalho. URDHAL et al. (2003) relatam altas frequências de STEC em fezes de ovinos (87,6%) e bovinos (64,6%) de uma mesma propriedade rural na Noruega. OLIVEIRA et al. (2007) encontraram frequência de 64,3% de STEC em búfalos no Estado de Minas Gerais, Brasil. ISLAM et al. (2008) relataram prevalência de 37,9% de STEC em búfalos em Bangladesh. TRISTÃO et al. (2007) identificaram linhagens de STEC em 65,0% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro e 28,0% no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que bovinos saudáveis no Brasil podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Neste trabalho foi observada uma frequência de 3,0% para *stx1*, 33,3% para *stx2*, 24,2% para *stx1* e *stx2*, 36,4% para *eae*, 3% para *stx1* e *eae*. Diferentemente do estudo feito por OLIVEIRA et al. (2007) que encontraram 22,0% de estirpes portadoras

do gene *stx1*, 38,5% de *stx2*, 39,5% de *stx1* e *stx2*, no entanto não foi isolado nenhuma cepa contendo o gene *eae* em búfalos no Estado de Minas Gerais. STELLA et al. (2008) encontrou uma frequência de 11,4% de *stx1*, 7,1% de *stx2*, 4,3% de *eae*, 2,1% de *stx1* e *stx2*, 0,6% de *stx1* e *eae* em bovinos. AIDAR-UGRINOVICH et al. (2007) encontraram em bezerros 49,0% de *stx1*, 16,0% de *stx2*, 34,0% possuía *stx1* e *stx2* e 25,0% de *eae*. De acordo com SANDHU et al. (1996) a presença do gene *eae* está associada com certos sorogrupos, como O26, O103, O111, O145 e O157. A intimina produzida pelo gene *eae* é fator-chave de colonização para STEC em bovinos recém nascidos e adultos (DEAN-NYSTROM et al., 1998). No entanto, mutantes intimina-negativos ainda são capazes de colonizar certos locais do trato gastrintestinal dos ruminantes, e isso indica que outros fatores de colonização podem estar presentes (VAN DIEMEN et al., 2005). Em humanos, STEC *eae* positivos estão relacionados a quadros severos de diarreia, principalmente colite hemorrágica, e SHU (PATON & PATON, 1998).

No presente estudo foi observado uma frequência de 47,6% do gene *ehxA* em STEC, e uma frequência de 66,7% em estirpes de EPEC com esse gene. Diferentemente do estudo feito por OLIVEIRA et al. (2007) que isolaram 78,0% de cepas de STEC isoladas de búfalos com o gene *ehxA*. AIDAR-UGRINOVICH et al. (2007) encontraram 51,0% de STEC isoladas de bezerros no Estado de São Paulo que possuíam o gene *ehxA* e 80,0% de EPEC que continham esse gene. BLANCO et al. (2004) encontraram 46,0% de cepas de STEC isoladas de fezes de gado e carne bovina na Argentina contendo o gene *ehxA*. PRADEL et al. (2008) isolaram cepas de STEC de pacientes com SHU na França que continham o gene *ehxA*. AFSET et al. (2006) observaram que alguns genes, entre eles *ehxA* foram estatisticamente relacionados a diarreia em humanos.

Neste estudo foi encontrada uma frequência de 85,7% de estirpes de STEC contendo o gene *iha*, e 75,0% de EPEC com esse gene. Resultado semelhante foi observado por OLIVEIRA et al. (2007) que encontraram 85% de cepas de STEC com o gene *iha* isolado de búfalos no Estado de Minas Gerais e LEOTTA et al. (2006) relatam

também alta frequência de STEC (76,0%) contendo o gene *iha* de mamíferos não domésticos na Argentina.

O presente estudo observou uma frequência de 14,3% de estirpes de STEC contendo o gene *efa1*, e 58,3% de estirpes de EPEC com esse gene. TATARCZAK et al. (2005) isolaram 56,7% de STEC contendo o gene *efa1* de diferentes fontes, entre elas humano, gado e alimento. BARDIAU et al. (2009) encontraram uma frequência de 92,0% de cepas de STEC e EPEC pertencentes ao sorogrupo O26 que continham o gene *efa1* isolados de gado e humano. A presença desse gene nos rebanhos bubalinos requerem atenção e cuidados na prevenção da contaminação de produtos destinados ao homem, já que esse gene foi estatisticamente associado à diarreia em humanos (AFSET et al., 2006).

Este trabalho obteve uma frequência de 9,5% de cepas de STEC com o gene *toxB*, e uma frequência de 50,0% de EPEC com esse gene. TATARCZAK et al. (2005) obtiveram uma frequência de 70,3% de cepas de STEC contendo o gene *toxB*, que foi isolado de varias fontes. BARDIAU et al. (2009) observaram que cepas de STEC e EPEC pertencentes ao sorogrupo O26 que foram isolados de gado e humanos com uma frequência de 79,0% de cepas com o gene *toxB*.

TATARCZAK et al. (2005) isolaram 3,1% e cepas de STEC com o gene *saa* de diferentes fontes. BLANCO et al. (2004) encontraram uma frequência de 22,0% de estirpes de STEC com o gene *saa* isolados de fezes de gado e produtos cárneos na Argentina. OLIVEIRA et al. (2007) isolaram de búfalos 83,5% de cepas de STEC contendo o gene *saa*. Estes resultados divergem dos obtidos no presente estudo, onde foi observado uma frequência de 23,8% de cepas de STEC contendo esse gene e 41,7% de cepas de EPEC com o gene *saa*. Estudos recentes indicam que cepas *saa*-positivas são mais frequentemente encontradas em STEC isolados de bovinos do que de humanos, sugerindo um papel importante desta adesina na colonização intestinal desses animais (JENKINS et al., 2003).

Este estudo observou que 100,0% das estirpes de STEC e 91,7% das estirpes de EPEC isoladas continham o gene *lpfA*<sub>O113</sub>. Resultado semelhante foi observado por LEOTTA et al. (2006) que obtiveram 100,0% de cepas de STEC contendo o gene

*lpfA*<sub>O113</sub> isolados de mamíferos não domésticos na Argentina. TATARCZAK et al. (2005) isolaram 33,0% de cepas de STEC contendo o gene *lpfA*<sub>O113</sub> isolados de diferentes fontes, como humano, gado e alimento. O gene *lpfA*<sub>O113</sub> foi detectado em diversas cepas de *E. coli* isoladas de humanos e animais (OSEK et al., 2000). A alta positividade desse gene nos rebanhos bubalinos estudados indica que búfalos podem ser considerados como potenciais fontes de infecção para humanos, já que Afset et al. (2006) observaram que esse gene foi estatisticamente associado a diarreia em humanos.

No presente estudo observou-se uma frequência de 16,7% de cepas de EPEC com o gene *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> e nenhuma cepa de STEC com esse gene. ISLAM et al. (2008) estudando amostras de búfalo e gado obtiveram 12,7% de positividade para o gene *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>. TATARCZAK et al. (2005) isolaram 77,3% de cepas de STEC pertencentes ao sorogrupo O157, isolados de diferentes fontes, como humanos, gado suínos, que continham o gene *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>. TOMA et al. (2006) observaram uma frequência de 6,7% de cepas de EPEC com o gene *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>. Entretanto LEOTTA et al. (2006) não encontraram nenhum isolado de mamíferos não domésticos com esse gene.

Este trabalho obteve uma frequência de 14,3% de estirpes de STEC contendo o gene *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub> e uma frequência de 16,7% de EPEC com esse gene. TATARCZAK et al. (2005) isolaram de diferentes fontes 58,1% de cepas de STEC contendo o gene *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>. LEOTTA et al. (2006) observaram que amostras de animais de zoológico foram negativas para esse gene.

A maioria das estirpes de *E. coli* apresentaram sensibilidade aos antibiogramas testados, entretanto a cefalotina foi o que apresentou menor porcentagem de estirpes sensíveis (48,5%). Resultado semelhante foi relatado por OLIVEIRA et al. (2007) que observaram que a maioria das estirpes de STEC isoladas de búfalos no Estado de Minas Gerais apresentou sensibilidade a quase todos os antibióticos testados. Esses resultados divergem dos observados em bovinos (STELLA, 2006), onde se observa uma alta taxa de multirresistência nas estirpes analisadas. Essa diferença talvez se dê pelo fato de as búfalas serem mais resistentes às infecções que

as vacas, principalmente devido sua rusticidade, sendo assim, utiliza-se menos antimicrobianos nesses animais, havendo, portanto, baixa seleção de mutantes resistentes.

Dos 33 isolados foi possível sorotipar 9 estirpes, das quais seis pertencem ao sorogrupo O26, uma estirpe pertence ao sorogrupo O111 e duas pertencentes ao sorogrupo O157. As demais estirpes não foram sorotipadas por não ter apresentado aglutinação aos sorogrupos presentes na bateria de soros. OLIVEIRA et al. (2007) identificaram os sorotipos O23, O74, O77, O82, O93, O141, e O176, sendo o sorotipo O74 o mais encontrado em nesses animais no Estado de Minas Gerais, mostrando que pode haver uma variação da frequência dos sorogrupos de acordo com a região estudada. O isolamento de estirpes pertencentes aos sorogrupos O26, O157 e O111 representa motivo de preocupação, pois estes sorogrupos são reconhecidos como sorogrupos de EPEC relacionados à doenças no homem (CAMPOS et al. 1994).

Segundo OLIVEIRA et al. (2007) a presença de cepas de EPEC e de STEC que contém determinados perfis genéticos, como *stx1 stx2 ehxA iha saa* ou *stx2 ehxA iha saa* merece melhor atenção como cepas de STEC que carregam o gene *stx2* que está associado a doenças severas no homem, como SHU. Entretanto essas cepas carregam ainda outros genes que podem aumentar a virulência. PRADEL et al. (2008) isolaram cepas de STEC de pacientes com SHU na França que continham o gene *stx1*, *stx2*, *eae*, *efa1* e *ehxA*. AFSET et al. (2006) observaram que os genes *efa1*, *ehxA* e *lpfA*<sub>O113</sub> foram estatisticamente relacionados a diarreia em humanos.

Embora as graves doenças humanas associadas a STEC e EPEC tenham sido pouco descritas no Brasil, podemos observar uma ocorrência significativamente elevada destas estirpes nos rebanhos bubalinos, bem como a correlação entre sorogrupos encontrados nestes animais e em pacientes humanos. Diante da frequência geral de STEC (63,6%) e da frequência de EPEC (36,4%), torna-se relevante a adoção de medidas de prevenção da contaminação por STEC e EPEC dos produtos de origem animal, especialmente bubalina, destinados ao consumo humano, porque búfalos leiteiros também podem ser considerados como reservatórios desses patótipos e podem se constituir em importante risco à saúde do homem.

## VII. CONCLUSÕES

1. A prevalência de STEC foi de 63,6%, enquanto a de EPEC foi de 36,4%.
2. De todos os genes estudados apenas o *bfp* não foi encontrado nas amostras analisadas.
3. Dentre a bateria de soros utilizada o sorogrupo mais freqüente foi o O26, seguido do O157.
4. As estirpes isoladas apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados.
5. As estirpes estudadas apresentaram genes de virulência que estão relacionados à graves doenças no homem, indicando que búfalos podem ser considerados como reservatórios de STEC e EPEC.

## VIII. REFERÊNCIAS

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.**, v.22, p. 221-230, 1999.

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of Virulence Genes Linked with Diarrhea Due to Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA Microarray Analysis and PCR. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3703–3711, 2006.

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

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.**, v.6, n.10, p.147-151, 2001.

BANATVALA, N., GRIFFIN, P. M., BARRETT, T. J., GREENE, K. D., BIBB, W. F., GREEN, J. H.; WELLS, J. G. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. **J Infect Dis**, v.183, p. 1063-1070, 2001.

BARDIAU, M., LABROZZO, S.; MAINILET, J. G. Putative Adhesins of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of Serogroup O26 Isolated from Humans and Cattle. **J Clin Microbiol**, v.47, p.2090–2096, 2009.

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. **J Infect Dis.**, v. 165, p. 979-980, 1992.

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.**, n.31, p.2483-2488, 1993.

BIEBER, D.; RAMER, S. W.; WU, C.; MURRAY, W. J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOOLNIK, G. K. Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.280, p. 2114-2118, 1998.

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

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



CAMPOS, L. C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T. A. T.; ANDRADE, J. R. S.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **J Infect Dis**, v.62, p. 3282-8, 1994.

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

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

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

DOYLE, M. P. *et al.* *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P. *et al.* **Foodborne Pathogenic Bacteria**. ASM Press, p. 171-191, 1995.

DUPONT, H. L.; FORMAL, S. B.; HORNICK, R. B.; SNYDER, M. J.; LIBONATI, J. P.; SHEAHAN, D. G.; LABREC, E. H.; KALAS, J. P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N. Engl. J. Med**, v. 285, p. 1-9, 1971.

FDA. **Manual de Enfermidades Transmitidas por Alimentos**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, p. 27-29, 1999.

FENG, P. C. H.; COUNCELL, T.; KEYS, C.; MONDAY, S. R. Virulence characterization of Shigatoxigenic *Escherichia coli* serotypes isolated from wholesale produce. **Appl Environ Microbiol.**, 2010.

FONG, J. S. C.; CHADAREVIAN, J. P.; KAPLAN, B. S. Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. **Pediatr Clin North Am**, v. 29, p. 835-856, 1982.

FRANKLIN, A. Current status of antibiotic resistance in animal production. **Acta Vet Scand**, n.92, p.23-28, 1999.

FURST, S.; SCHEEF, J.; BIELASZEWSKA, M. RUSSMAN, H.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. Identification and Characterization of *Escherichia coli* strains O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. **J Medical Microbiol**, v. 49, p. 383-386, 2000.

GOBIUS, K. S.; HIGGS, G. M.; DESMARCHELIER, P. M. Presence of Activatable Shiga Toxin Genotype (*stx2d*) in Shiga Toxigenic *Escherichia coli* from Livestock Sources. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3777-3783, 2003.

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**, v.164, p.331-337, 1991.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cow's milk yogurt and ewes' milk yogurt. **J Dairy Res.**, v.69, p.655-660, 2002.

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**. v.13, p.60-98, 1991.

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.; OSTHERHOLM, M. T. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39: NM: an agent that that

does not fit into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. **J Infect Dis**, v.176, p.1625-1628, 1997.

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

ISLAM, M. A.; MONDOL, A. S.; DE BOER, E.; BEUMER, R. R.; ZWIETERING, M. H.; TALUKDER, K. A.; HEUVELINKET, A. E. Prevalence and Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Slaughtered Animals in Bangladesh. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, p.5414–5421, 2008.

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

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**, v.27, sup.1, 1995.

KARMALI, M. A. *et al.* The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, v. 151, p. 775-782, 1985.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PERSONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.40, 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.

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.

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.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, n.5, p.1664-1668, 1995.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli* . In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington APHA , 2001. p. 331-341.

MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A. D. Structure, Biology and Relative Toxicity of Shiga Toxin Family Members for Cells and Animals. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 122-124.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v.11, 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.

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

OLIVEIRA, M. G.; BRITO, J.R.F.; CARVALHO, R.R.; GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; KATO, M.A.M.F.; RAMOS, I.I.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) as an Important Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v.73, p.5945-5948, 2007.

ORSKOV, F; ORSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: **Methods in Microbiology**. Londres: Academic Press, Inc, v. 14, p. 43-112, 1984.

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

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

PATON, A. W.; J. C. PATON. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 271–274, 2002.

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of

Saa, a novel autoagglutinating adhesion produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infectious and Immunology**, Washington, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PRADEL, N.; BERTIN, Y.; MARTIN, C.; LIVRELL, V. Molecular Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome patients and dairy samples in France, **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.2118–2128, 2008.

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. **Pathol Biol**. v. 54, p. 600-602, 2006.

SANDHU, K. S., CLARKE, R.C.; MCFADDEN, K.; BROUWER, A.; LOUIE, M.; WILSON, J.; LIOR, H.; GYLES, C.L. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. **Epidemiol Infect**, v.116, p.1–7, 1996.

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

SCHMIDT, H.; ZHANG, W.L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P.I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.69, p.6863–6873, 2001.

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

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**. v.35, n.4, p.375-379, 2001.

SLANEC, T.; FRUTH, A.; K. CREUZBURG, K.; SCHMIDT, H. Molecular Analysis of Virulence Profiles and Shiga Toxin Genes in Food-Borne Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v.75, p.6187–6197, 2009.

STELLA, A. **Aspectos epidemiológicos e suscetibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* O157:H7 e outros sorogrupos isoladas de fezes de bovinos leiteiros, água e leite na região de Ribeirão Preto-SP**. 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2006.

STELLA, A. E.; RIGOBELLO, E. C.; OLIVEIRA, A. C.; MALUTA, R. P.; MARIN, J. M.; ÁVILA, F. A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, p. 66-74, 2008.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIE`RARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence of bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Res Microbiol**, v.153, p.653–658, 2002.

TARR, C. L., LARGE, T. M.; MOELLER, C. L.; LACHER, D. W.; TARR, P. I.; ACHESON, D. W.; WHITTAM, T.S. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.70, p.6853–6859, 2002.

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

TATARCZAK, M.; WIECZOREK, K., POSSE, B.; OSEK, J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Vet Microbiol**, v.110, p.77–85, 2005.

TOMA, C.; ESPINOSA, E. M.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.42, p.4937–4946, 2004.

TOMA, C.; HIGA, N.; IYODA, S.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. **Res Microbiol**, v.157, p.153–161, 2006.

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.

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.

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

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R., LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.42, p.1787–1789, 2004.



VOLD, L.; KLUNGSETH, J. B.; KRUSE, H.; SKJERVE, E.; WASRESON, Y. Occurrence of shigatoxigenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. **Epidemiol Infect**, v. 120, p. 21-28, 1998.

WASTESON, Y. Zoonotic *Escherichia coli*. **Acta Vet Scand.**, 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**, v. 56, p. 106-111, 1988.

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 *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroups O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.22, p.726-730, 2003.