

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Escherichia coli **PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)**
ISOLADAS DE BOVINOS DE CORTE DO ESTADO DO PARANÁ

Caroline Peters Pigatto

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Co-orientadores: Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth

Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária – Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

Pigatto, Caroline Peters
P628c Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*
produtora de toxina shiga (STEC) isoladas de bovinos de corte do
estado do Paraná / Caroline Peters Pigatto – Jaboticabal, 2008
xiv, 84 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Rubén Pablo Schocken-Iturrino
Banca examinadora: Luiz Augusto do Amaral, Helio José
Montassier, Alessandra Aparecida Medeiros, Elaine Cristina Pereira
De Martinis
Bibliografia

1. *Escherichia coli*. 2. toxina Shiga. 3. STEC. 4. *stx* I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAROLINE PETERS PIGATTO – Nascida a 30 de janeiro de 1977 em Curitiba/Pr. Concluiu o segundo grau no Colégio Marista Santa Maria, em 1994. Iniciou o curso de Medicina Veterinária em 1996, na Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC/Pr, concluído em fevereiro de 2001. Durante o curso realizou trabalhos com microbiologia e monitoria na disciplina de Microbiologia Veterinária. Em março de 2002 iniciou o curso de Mestrado em Ciências Veterinárias com ênfase em Microbiologia na Universidade Federal do Paraná – UFPR, concluído em fevereiro de 2004. Em março de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva na Universidade Estadual Paulista – UNESP/Campus Jaboticabal, concluído em fevereiro de 2008.

Quando iniciamos a vida, cada um de nós recebe um bloco de mármore e as ferramentas necessárias para converter este bloco em escultura.

Podemos arrastá-lo intacto a vida toda, podemos reduzi-lo a cascalho, ou podemos dar-lhe uma forma gloriosa.

Eis aqui um teste para verificar se sua missão na Terra está cumprida.

Responda rápido: você está vivo?

Se a resposta é SIM, então ainda falta muita coisa a fazer.

Richard Bach

**Dedico este trabalho as pessoas que são a base da minha vida!
Aos meus avós Irineu e Delorme,
aos meus pais Carmen e Ernani
e a minha irmã Mariane.**

AGRADECIMENTOS

Chegar ao fim deste estudo me mostrou como é importante o trabalho em equipe! Por isso agradeço:

A Deus que está sempre ao meu lado me iluminando.

Aos meus avós Irineu e Delorme Peters, fonte inspiradora e grande exemplo de vida. Agradeço sempre a Deus por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas como vocês!

A minha mãe e melhor amiga Carmen Sueli Pigatto, que sempre me proporcionou uma vida estruturada e muito feliz e para quem sempre recorro para contar alegrias e frustrações. Sua capacidade criativa e sua inteligência são, para mim, estímulos constantes para seguir em frente. Sem seu apoio certamente não chegaria até aqui.

Ao meu pai Ernani Pigatto, que desde a infância me propiciou uma perfeita formação educacional. Graças ao seu esforço e dedicação, eu tive subsídios para terminar um trabalho como este.

A minha querida irmã Mariane Pigatto, que me ensinou a compartilhar. Com seu jeito carinhoso e meigo tornou minha vida mais alegre. Conte sempre comigo!

Ao meu esposo Andriago Barboza De Nardi que com seu entusiasmo e com seu amor traz a minha vida muita felicidade. Sua ajuda e apoio foram fundamentais.

Ao meu amigo e orientador Prof. Ruben Pablo Schocken-Iturrino seu jeito alegre e amigo de ensinar e aconselhar transforma árduas tarefas em atividades agradáveis! Que nossa amizade perdure para sempre!

A minha querida mestra e amiga Profa Cyntia M. T. Fadel-Picheth tenho seu entusiasmo e sua capacidade profissional como exemplo. Seu apoio e seus ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento científico. Espero, um dia, ser uma profissional tão competente quanto você!

A pesquisadora Kinue Irino (Instituto Adolfo Lutz), referência nacional em *Escherichia coli*. Obrigada pelos seus ensinamentos e apoio!!

Ao Prof. José Moacir Marin pela ajuda e apoio.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Microbiologia da UNESP; Silvina Berchielli, Tammy P. Chioda, Gisela Garcia, Adriana Ragazani, Juliano Vittori, Edna Testa, Gislaine Barbosa, César Martins, Érica Oliveira e Kátia Trovó. Eu adorei os estudos em conjunto e as nossas saídas para comer espetinho! Este período ficará sempre na minha memória!

As minhas amigas do laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da UFPR; Sônia S.S. Farah, Cibelle Dalagassa, Mônica Surek, Lauriane Faveri, Octaviana e Fabiana De Toni, pela ajuda direta no experimento e pela amizade que ficará para sempre guardada em meu coração!

As minhas queridas irmãzinhas e companheiras de república Thatiana Motheo, Marcy Lancya Pereira, Virginia Tessarine e Sofia Borin. É muito bom chegar em casa e sentir a alegria transmitidas por vocês, sentar na mesa para jantar e compartilhar histórias e experiências. Sentirei muitas saudades. Quero, mesmo de longe, acompanhar a caminhada de cada uma, saber se estão bem e saber das grandes realizações que certamente ocorrerão!!

A minha cachorrinha Neguinha, companheira da graduação ao doutorado!

E a todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram durante esta jornada.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Fatores de Virulência de STEC	5
2.2 Reservatório da STEC	9
2.3 Incidência de Infecções por STEC em Humanos	10
2.4 Manifestações Clínicas	13
2.5 Formas de Transmissão de STEC	14
2.6 Métodos Diagnósticos para Detecção de STEC	16
3. OBJETIVO.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Amostras	22
4.2. Determinação dos Sorotipos de STEC	22
4.3. Detecção da Expressão da Toxina Shiga Através de Imunoensaio	23
4.4. Caracterização Genotípica das STEC	23
4.4.1. PCR – Multiplex.....	23
4.4.2. Detecção dos Produtos de PCR.....	25
4.4.3. Ensaios de PCR-RFLP.....	25
4.5. Sequenciamento de DNA	27
4.5.1. Amplificação dos Genes do Tipo <i>stx</i> ₂ por PCR	27
4.5.2. Purificação do Produto de PCR	27
4.5.3. Reação de Sequenciamento	27
4.6. Perfil de Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos	28
4.7. Viabilidade de isolados de STEC em queijo minas frescal.	29
4.7.1. Determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes no leite pasteurizado.....	29
4.7.2. Isolados de STEC utilizados para inoculação no leite.....	29
4.7.3. Processo de Produção do Queijo Tipo Minas Frescal.....	29
4.7.4. Detecção de STEC a partir do queijo elaborado.	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Sorologia	31
5.2. Expressão da Toxina Shiga	33
5.3. Caracterização Genotípica das STEC	34
5.4. Subtipagem do Gene <i>stx</i>₂	37
5.5. Sequenciamento de Cepas de STEC	42
5.6. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	43
5.7. Viabilidade de cepas STEC em Queijo Minas Frescal	44
5.7.1. Determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes no leite pasteurizado.....	44

5.7.2. Detecção de STEC a partir do queijo elaborado	45
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	53
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
9. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - “attaching and effacing”
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CH – colite hemorrágica
CT-SMAC – ágar MacConkey sorbitol com cefixima e telurito
DAEC – *E. coli* de aderência difusa
EAEC – *E. coli* enteroagregativa
EIEC - *E. coli* enteroinvasiva
EPEC - *E. coli* enteropatogênica
ETEC - *E. coli* enterotoxigênica
FDA – “Food and Drug Administration – Estados Unidos”
HELA – células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano
OMS – Organização Mundial da Saúde
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP – polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
pmol - picomol
PTT – púrpura trombocitopênica trombótica
SHU – síndrome hemolítica urêmica
SLT – “Shiga-like toxin”
SMAC – ágar MacConkey sorbitol
STEC - *E. coli* produtora de toxina Shiga
Stx – toxina Shiga
Stx1 – toxina Shiga 1
Stx2 – toxina Shiga 2
VERO – células de rim de macaco verde africano
IAL – Instituto Adolfo Lutz
 μL – microlitro

LISTA DE TABELAS

1. Iniciadores utilizados na PCR multiplex para amplificação dos genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> , <i>ehxA</i> e <i>saa</i>	24
2. Perfil de restrição de variantes <i>stx</i> ₂ obtido com as enzimas <i>HincII</i> e <i>Accl</i> , segundo DE BAETS et al.,(2004).....	26
3. Perfil de restrição de variantes <i>stx</i> ₂ obtido com as enzimas <i>PvuI</i> e <i>HaeIII</i> , segundo DE BAETS et al.,(2004).....	26
4. Sorotipos de STEC identificados e suas respectivas freqüências em fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.....	32
5. Total de amostras com as características do ensaio VTEC-RPLA e da PCR Multiplex provenientes de fezes de bovinos oriundos do Estado do Paraná.....	33
6. Expressão da toxina Shiga e presença de genes de virulência nas STEC estudadas, isoladas de fezes de bovinos de corte provenientes do Estado do Paraná.....	34
7. Freqüência de subtipos de <i>stx</i> ₂ identificados nas amostras de STEC isoladas de fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.....	38
8. Antibiograma das STEC isoladas de fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.....	43

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura do tipo A:B da toxina Shiga de *Escherichia coli*.....6
2. Perfis genotípicos identificados nas Cepas de STEC isoladas de fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.....37
3. Representação em gel de agarose (2%) contendo produtos de PCR para detecção do gene *stx₂* (amplificação de 1400pb) com o iniciador OLI (DE BAETS et al. 2004).....39
4. PCR-RFLP do gene *stx₂* mostrando perfil compatível com *stx₂OX3a/O111* e *stx₂*.....40
5. PCR-RFLP do gene *stx₂* mostrando perfil compatível com *stx₂* e *stx_{2vha}*.....41
6. Teste de sensibilidade da amostra CP11 de STEC a antimicrobianos. Observar halos de inibição em torno dos discos.....44

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE BOVINOS DE CORTE DO ESTADO DO PARANÁ.

RESUMO - *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são reconhecidas como agentes causadores de infecções em humanos em todo o mundo. O principal reservatório é o bovino. Neste trabalho, cepas de STEC previamente isoladas de fezes bovinas foram caracterizadas usando PCR multiplex para determinar os genes de virulência (*stx*₁, *stx*₂, *ehxA*, *eaeA* e *saa*), soroglutinação passiva reversa em látex (RPLA-VTEC screen) para avaliar a expressão da toxina Shiga, PCR-RFLP e sequenciamento para obter os subtipos e a variabilidade dos genes *stx*₂, respectivamente. Foram determinados também os sorotipos, o perfil de sensibilidade e a viabilidade das cepas de STEC em queijo minas frescal. A frequência de STEC nas amostras de fezes bovinas foi de 37%. Foram encontrados trinta e quatro sorotipos de STEC sendo os mais frequentes o ONT:H7 (10%), O22:H8, O22:H16 e ONT:H21 (7% cada). Onze sorotipos encontrados não tinham sido associados com STEC até o momento. A maioria das STEC (96%) foi susceptível a todos os antimicrobianos testados. A produção de toxina Shiga determinada pelo ensaio RPLA foi de 89%. Os marcadores de virulência foram encontrados em 11 diferentes combinações, a mais frequente foi *stx*₂ (27%), *stx*₁ *stx*₂ e *stx*₁ *stx*₂ *ehxA* *saa* (16% cada). Foram detectados 8 subtipos de *stx*₂: *stx*₂OX3a/O111; *stx*₂; *stx*_{2c}; *stx*_{2(vha)}; *stx*_{2(vhb)}; *stx*₂OX3b; *stx*_{2vnb/vhc} e *stx*₂O48. Os genes que apresentaram maior frequência foram: *stx*₂ e *stx*_{2c}. As seqüências parciais obtidas sugerem a presença de elevada variabilidade nos genes do tipo *stx*₂ nas STEC analisadas. A viabilidade de STEC não-O157 em queijo minas revelou que diferentes cepas de STEC podem ser detectadas nos queijos após 10 dias de armazenamento sob refrigeração. Os dados encontrados neste trabalho sugerem isolados com alto potencial de patogenicidade oferecendo risco de desencadear graves infecções à população.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; toxina Shiga, STEC, *stx*.

**FENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF SHIGA TOXIN-PRODUCING
Escherichia coli STRAINS (STEC) ISOLATED FROM BEEF CATTLE OF PARANÁ
STATE-BRAZIL.**

ABSTRACT - Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is recognize worldwide as an organism capable to cause human diseases. Cattle are the main source of STEC. In this research, STEC strains previously isolated were analyzed using multiplex-PCR for virulence genes, the RPLA assay to detect the Shiga toxin production and serotyping. PCR-RFLP and nucleotide sequence were analyzed to detect *stx*₂ genes subtypes and their variability. Moreover tests for antimicrobial susceptibility and the viability of STEC in Minas Frescal cheese were done. The frequency of cattle shedding STEC was 37%. Thirty-four serotypes of STEC were found, the most frequent being ONT:H7 (10%), O22:H8, O22:H16 and ONT:H21 (7% each). Eleven serotypes had not been associate with STEC until the moment. Most of the strains (96%) were susceptible to all antimicrobial agents tested. Production of Shiga toxin by the RPLA assay was detected in most (89%) of the STEC strains. The frequency of virulence markers were found in 11 diferent combinations: *stx*₂ (27%), *stx*₁ *stx*₂ e *stx*₁ *stx*₂ *ehxA saa* (16% each). Eighth *stx*₂ subtypes were detect (*stx*_{2OX3a/O111}; *stx*₂; *stx*_{2c}; *stx*_{2(vha)}; *stx*_{2(vhb)}; *stx*_{2OX3b}; *stx*_{2vnb/vhc}; *stx*_{2O48}) and the most frequent were: *stx*₂; *stx*_{2c}. The partial sequences of *stx*₂ genes suggested a high variability of *stx*₂ types in the STEC analyzed. The STEC viability in cheese could be detected after 10 days of storage under refrigeration. The results found in this work suggest strains with high potential of pathogenicity offering risk to lead serious infections to the population.

Key-words: *Escherichia coli*; STEC, Shiga toxin, *stx*

1. INTRODUÇÃO

As bactérias da espécie *Escherichia coli* são bastonetes Gram negativos que fazem parte da microbiota intestinal dos mamíferos. Algumas cepas estão associadas a patologias intestinais e extraintestinais. As linhagens de *E. coli* patogênicas causadoras de infecções entéricas no ser humano e nos animais envolvem seis categorias: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Dentre estas categorias, as STEC destacam-se devido ao seu potencial zoonótico emergente (KONEMAN et al.,2001).

Desde o primeiro relato de surto causado por STEC em 1982, esta linhagem foi associada a um amplo espectro de doenças no ser humano, variando de diarreia branda a complicações graves como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO & KAPER, 1998).

As STEC são reconhecidas como um importante grupo de patógenos emergentes e tornaram-se um grande desafio à saúde pública, pois possuem um alto grau de infectividade para os seres humanos, mesmo em baixo número no alimento ingerido (10 UFC) são capazes de provocar infecção. O aumento gradativo da ocorrência de surtos alimentares causados por STEC em todo o mundo tem mostrado a importância da obtenção de informações sobre a epidemiologia dessa bactéria e de seus reservatórios. Neste sentido, o principal reservatório de STEC são os bovinos, que as elimina por meio das fezes. Estas bactérias de maneira direta ou indireta podem atingir a cadeia alimentar dos seres humanos causando graves doenças (WHO, 1998).

Embora se enfatize o estudo da *Escherichia coli* O157:H7, mais de 200 sorotipos não-O157 já foram associados com infecções entéricas. No entanto a frequência, geralmente, é subestimada pela inexistência de métodos eficazes de isolamento. As dificuldades ocorrem devido ao baixo número de microrganismos por grama de fezes, bem como pela presença de microbiota competitiva. Em alguns países da Europa, América Latina e na Austrália, a maioria dos casos de colite hemorrágica e síndrome

hemolítica urêmica são causados por STEC não-O157 sendo estabelecida assim a importância de métodos específicos de detecção e caracterização destas cepas igualmente toxigênicas (WHO, 1998).

A emergência deste patógeno gerou grande preocupação mundial, pelo número de pessoas afetadas e por distintos veículos de transmissão identificados (ressaltando produtos de origem animal), o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a promover medidas de controle e prevenção. No Brasil são poucas as informações disponíveis sobre o assunto, embora sejam reconhecidos casos esporádicos de diarreia provocados pela STEC que ocorrem com mais frequência em crianças. Ainda estudos relacionados ao reservatório apontam uma predominância de STEC não-O157 no rebanho bovino brasileiro (PATON & PATON, 1998).

Devido à escassez de dados nacionais a respeito deste patógeno, surgiu a proposta deste trabalho. O conhecimento sobre a epidemiologia da STEC contribuirá para o controle da disseminação deste agente, diminuindo os riscos de infecção ao ser humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo da família Enterobacteriaceae que faz parte da microbiota intestinal do ser humano e dos animais. Mas existem cepas patogênicas associadas a uma grande variedade de infecções intestinais e extraintestinais (NATARO & KAPER, 1998).

Este microrganismo, isolado de fezes de neonatos foi descrito primeiramente em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodore Escherich como “Bacterium coli comune”. Muitos estudos sobre o metabolismo e os processos bioquímicos dessa bactéria foram conduzidos e tornaram-se a base para o estudo das enterobactérias em geral e da *Escherichia coli* em particular (GYLES, 1994).

Até 1950, este microrganismo foi considerado como habitante não patogênico do trato entérico do ser humano e dos animais de sangue quente (WASTENSON, 2001). A tipagem sorológica tem sido amplamente utilizada para caracterizar a *Escherichia coli*. Porém, uma vez que os fatores de virulência estão mais diretamente associados com a patogenicidade do que os antígenos de superfície, apenas a sorologia não é adequada para caracterizar cepas de *E. coli* como patogênicas (FORBES et al., 2002). A identificação das cepas patogênicas de *E. coli* baseia-se, sobretudo na presença de genes de virulência associados a cada categoria do enteropatógeno e utiliza-se, principalmente métodos moleculares (NATARO & KAPER, 1998).

As principais categorias diarreogênicas de *E. coli* são: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enteroagregativa (EAEC), aderência difusa (DAEC) e produtora de toxina Shiga (STEC). Linhagens pertencentes a cada categoria utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, consequência 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). Dentre o grupo das diarreogênicas destaca-se a *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), capaz de causar desde diarreia não

complicada a colite hemorrágica (CH), e doenças potencialmente fatais como síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO & KAPER, 1998).

O primeiro relato sobre *E. coli* produtora de toxina Shiga foi feito por KONOWALCHUCK et al., (1977) analisando cepas isoladas de pacientes com diarreia. Estes autores verificaram o efeito citotóxico irreversível da toxina Shiga em células Vero (células de rim de macaco verde africano). A toxina identificada foi denominada de verotoxina, nomenclatura utilizada até hoje por alguns pesquisadores.

Após, estudos realizados nos Estados Unidos por O'BRIEN et al., (1982), identificaram entre cepas de *E. coli* pertencentes a sorogrupos considerados EPEC, a produção de uma citotoxina letal para células Hela (células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano), cujo efeito era neutralizável por antisoros contra a toxina da *Shigella dysenteriae* tipo 1, denominando-a, então, de Shiga-like toxin (SLT).

RILEY et.al., (1983), ao investigar dois surtos de colite hemorrágica e SHU veiculados por hambúrguer mal cozido nos Estados Unidos, confirmaram a STEC como um patógeno humano. Estes pesquisadores isolaram um sorotipo até então raro de *E. coli*, o O157:H7. O quadro foi caracterizado por dores abdominais severas, diarreia aquosa inicial seguida de diarreia hemorrágica.

Em 1983, O'BRIEN e colaboradores relataram que *E. coli* do sorotipo O157:H7 produzia toxina similar a produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1. No Canadá, JOHNSON e colaboradores em 1983 relataram que *E. coli* O157:H7 isolada de pacientes com colite hemorrágica produziam uma citotoxina ativa em células Vero.

Hoje, a denominação STEC é utilizada para se referir a um grupo de *Escherichia coli* que apresenta como característica comum a produção de toxina Shiga. Além da *Escherichia coli* O157:H7, outros sorotipos de STEC, conhecidos como STEC não-O157, também provocam doenças em seres humanos e são predominantes em vários países (BEUTIN et al., 1993; BOERLIN et al., 1999; FEY et al., 2000; VAZ et al., 2004).

A STEC é similar a outras *E. coli* em termos de propriedades bioquímicas, gerando dificuldades no diagnóstico em laboratórios de rotina. Apenas fatores de virulência como a produção de toxina Shiga, permite distinguir a STEC dos demais isolados de *E. coli* (TSCHÄPE & FRUTH, 2001).

2.1 Fatores de Virulência de STEC

O mecanismo de patogenicidade das STEC é complexo e envolve vários fatores de virulência. A produção da toxina Shiga é característica comum a todas as STEC (PATON & PATON, 1998).

- Toxinas Shiga (Stx)

As STEC são diferenciadas de outras *Escherichia coli* pela produção de um ou dois tipos de potentes toxinas denominadas toxinas Shiga, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese protéica nas células alvo (PATON & PATON, 1998).

O gene *stx*, que codifica a toxina, está 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* (FÜRST et al., 2000).

A existência de mais de um tipo de toxina Stx foi verificada quando o antisoro anti-Stx não neutralizou a citotoxicidade da toxina produzida por uma cepa de STEC (PATON & PATON, 1998). As toxinas Stx são geneticamente relacionadas e apresentam atividades biológicas similares, mas são distintas antigenicamente. A família das toxinas Stx produzidas pela *E. coli* possui dois grupos: Stx1 e Stx2. STEC pode produzir Stx1, Stx2 ou ambas as toxinas. Stx1 diverge da Stx2 na sequência 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 é constituída de um polipeptídio A e cinco polipeptídios B;
- O receptor na célula eucariótica é o glicolípido 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 é mais tóxica para as células endoteliais microvascular renal humana do que a Stx1 (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998).

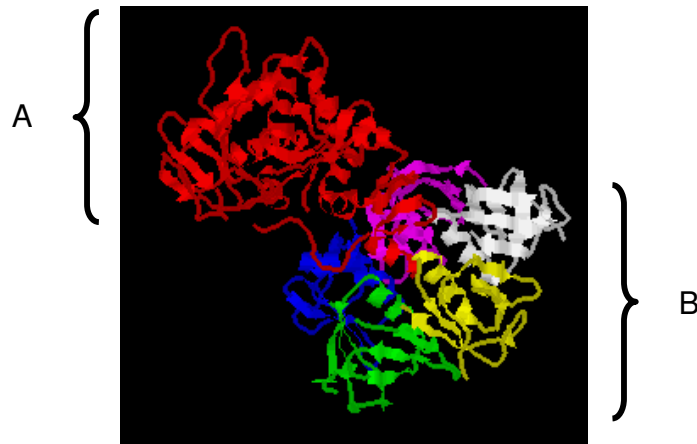


FIGURA 1 – Estrutura do tipo A:B da toxina Shiga de *Escherichia coli*. (Fonte: www.textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html)

As toxinas Stx1 e Stx2 possuem a estrutura 1A:5B (Figura 1). O polipeptídeo B forma um pentâmero que é responsável pela adesão ao receptor glicolipídico, globotriosilceramida de células eucarióticas. A subunidade A é internalizada e clivada pela tripsina gerando as porções A1 (28kDa) e A2 (4kDa). O polipeptídeo A1 inibe a síntese protéica celular. O peptídeo A2 é requerido para ligar a porção A1 ao B pentâmero que se liga ao receptor (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998).

O grupo Stx2 é altamente heterogêneo, com diversas variantes já descritas (NAKAO et al.,2002). Além de Stx2 clássica existem variantes como Stx2c, Stx2vha, Stx2vhb, Stx2vhc, Stx2Ox3b, Stx2O111, Stx2O48, Stx2O118, Stx2OX393, Stx2OX392, Stx2e e Stx2ev (BASTIAN et al.,1998; DE BAETS et al.,2004). Existem variantes que apresentam alta similaridade (aproximadamente 96% na sequência de aminoácidos da subunidade B e de 99 a 100% na subunidade A) com Stx2 como Stx2c, Stx2vha, Stx2vhb e Stx2OX393. Já em variantes como Stx2O111, Stx2OX392, a similaridade é de

aproximadamente 86% para a subunidade B e 95% para a subunidade A (BASTIAN et al.,1998; PIÉRARD et al.,1998; NAKAO et al.,2002).

A susceptibilidade celular à toxina Shiga é determinada pela presença de receptores para a toxina na superfície da célula. Nos seres humanos esses receptores estão presentes principalmente nas células epiteliais do intestino, nas células do endotélio vascular e nas células do epitélio renal (O'BRIEN & HOLMES, 1987). As consequências de uma infecção por STEC, são claramente diferentes entre os seres humanos e os bovinos, por falta de patogenicidade neste último. Assim, sugere-se que os bovinos são insensíveis à ação da toxina Shiga ou que estas toxinas têm atividade diferenciada entre estes dois hospedeiros (SMITH et al.,2002). PRUIMBOOM-BREES et al.(2002), sugerem que a falta de receptores vasculares para a toxina Shiga, explicaria o fato dos bovinos serem portadores sadios de STEC.

O sequenciamento dos genes *stx*, *stx*₁ e *stx*₂ que codificam, respectivamente, as toxinas Shiga produzidas por *Shigella dysenteriae* do tipo 1, e Stx1 e Stx2 de STEC, permitiu elucidar e comparar as estruturas desses genes e a sequência de aminoácidos dessas proteínas. Substituições de nucleotídeos encontradas nas sequências de *stx*₁ e *stx*₂ em algumas STEC levaram a descrição de formas variantes destes genes. Na literatura, diferentes designações são utilizadas para os mesmos genes causando, muitas vezes, confusão. No grupo das toxinas Stx1 poucas variantes foram descritas, destacando-se Stx1c (PATON et al.,1993a.; PATON et al.,1995; BASTIAN et al.,1998; ZHANG et al.,2002; BÜRK et al., 2003).

- Intimina

Foi relatada uma relação direta entre a presença do gene *eae* e a capacidade da STEC em causar doenças graves nos seres humanos. O gene *eae* codifica uma proteína externa de membrana, denominada Intimina. Esta proteína é um fator de virulência mediador no ataque ao enterócito, produzindo uma lesão intestinal do tipo “attaching and effacing” (AE); “attaching” que indica íntima adesão ao enterócito e,

“effacing”, desaparecimento das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal (WILLSHAW et al.,1994, CHINA et al.,1996).

- Enterohemolisina

Outro fator de virulência produzido pela STEC é a enterohemolisina, codificada pelo gene *hly* (FAGAN et al.,1999). Sua produção está, geralmente, associada ao plasmídeo pO157, mas os genes da enterohemolisina também podem ser encontrados em outros plasmídeos de alta massa molecular presentes na STEC (BRÜNDER 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 colite hemorrágica e da síndrome hemolítica urêmica ainda é incerto. Uma alternativa seria que a hemoglobina liberada pela ação da enterohemolisina provê uma fonte de ferro que favoreça a multiplicação da STEC no intestino (LAW & KELLY, 1995).

- Adesina Saa (STEC *autoagglutination adhesin*)

A adesina Saa foi identificada pela primeira vez por Paton e colaboradores em 2001, na STEC O113:H21 isolada de um surto de SHU. Essa cepa não possui a ilha de patogenicidade LEE que contém o gene *eae*. 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).

O gene *saa* foi detectado, além do sorotipo O113:H21, em outras cepas STEC isoladas de casos esporádicos de SHU, o que sugere que Saa possa ser um fator de virulência em STEC LEE-negativa isoladas de humanos (PATON & PATON, 2002).

JENKINS et al.,(2003), relatam uma íntima relação entre Saa e a adesão da STEC no intestino de bovinos.

2.2 Reservatório da STEC

O bovino é o principal reservatório de STEC, eliminando-as pelas fezes as quais, de maneira direta ou indireta, atingem a cadeia alimentar dos seres humanos podendo causar doença (BEUTIN et al.,1995). As taxas de colonização de STEC em rebanhos bovinos são variadas, podendo chegar a 60%, mas as taxas típicas variam entre 10 a 40% (NATARO & KAPER, 1998; PIGATTO, 2004; FARAH et al.,2007).

A STEC é comumente isolada em animais saudáveis, mas pode estar associada a episódios iniciais de diarreia em animais jovens seguida por colonização assintomática (NATARO & KAPER, 1998). Ao estudar a presença do receptor de Stx (globotriosilceramida) nos bovinos, não foi observada sua presença no intestino, mas apenas no cérebro e no rim. Este dado explica o não desenvolvimento de doença entérica nestes animais (BREES et al.,2000).

Pesquisas procuram esclarecer o mecanismo de infecção natural do bovino por STEC, bem como a eliminação fecal do microrganismo (WHO, 1998). REIMANN et al.,(1998) verificaram que o período de eliminação da STEC nas fezes dos bovinos pode variar entre 8 a 46 dias. Utilizando a inoculação experimental, destacou-se o caráter assintomático dos animais. A recuperação da STEC ocorre a partir do conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos não havendo disseminação para outros órgãos. O experimento mostrou ainda que a primeira infecção não previne a reinfecção (CRAY et al.,1995).

SHERE et al.,(1998) citaram que um animal pode ser reinfetado pelo mesmo isolado de STEC, indicando uma baixa proteção imunitária. Assim, episódios recorrentes com alta prevalência de STEC no rebanho podem indicar exposição dos animais a alguma fonte deste agente. Portanto, se os fatores que diminuem a resistência à colonização fossem identificados e eliminados, poderia diminuir

substancialmente, a exposição dos seres humanos a este patógeno emergente (BESSER et al.,1997). Alguns fatores contribuem para a presença e disseminação das STEC no rebanho, tais como, práticas de manejo, dieta, estresse, densidade populacional, região geográfica e sazonalidade (KUDVA et al.,1996; DARGATZ et al.,1997).

A STEC está presente no intestino tanto no gado de corte como no gado leiteiro e a excreção é mais comum em períodos quentes. A prevalência é maior em animais jovens e o agente pode permanecer viável no meio ambiente por até dois anos (HANCOCK et al.,1998).

A dieta alimentar do animal está diretamente relacionada à excreção de STEC, principalmente no rebanho confinado. A influência da dieta está na habilidade da *Escherichia coli* em desenvolver resistência ao pH ácido, aumentando o risco de doenças de origem alimentar no ser humano. Normalmente a acidez estomacal é uma barreira efetiva à infecção dos patógenos alimentares. Porém a adaptação que a STEC sofreu no rúmen do bovino a torna capaz de sobreviver a este mecanismo de defesa (CRAY et al.,1995).

Os hospedeiros naturais, além dos bovinos, são animais silvestres e domésticos incluindo os ovinos, caprinos, suínos, felinos e cães (GRIFFIN & TAUXE, 1991; BEUTIN et al.,1993). BEUTIN et al.,(1993) obtiveram indícios de que aves podem servir de reservatório para STEC, já que este patógeno é capaz de colonizar o ceco de galinhas, sendo eliminado pelas fezes.

2.3 Incidência de Infecções por STEC em Humanos

Estima-se que, nos EUA, a STEC cause pelo menos 10.000 a 20.000 episódios por ano e cerca de 200 a 500 óbitos que ocorrem mais comumente em crianças e jovens (BROTAM et al.,1995). Segundo KENSH & ACHECON, 2002 este agente já foi considerado causa mais freqüente de insuficiência renal aguda em crianças nos EUA. STEC, de um modo geral, tem sido encontrada em 75% dos episódios de síndrome

hemolítica urêmica na Europa, América do Norte, Canadá e América Latina, especialmente na Argentina (LOPEZ et al.,1998).

Em países como Alemanha, Noruega, Suíça e Áustria os casos de diarreia por STEC excederam a 2%, enquanto que em países como a Itália foi menor que 1%. Nos casos relatados o sorogrupo O157 representou menos que um terço das STEC isoladas. Os casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU), por exigir hospitalização, são identificados com mais facilidade, sendo a SHU considerada um bom indicador da frequência de infecções por STEC. Os países com maior incidência de SHU no continente Europeu são Alemanha com 19 casos para cada 100.000 crianças até 15 anos, seguida pela Holanda, Suíça e Bélgica com 1,5 para 100.000. Os países do Sul da Europa possuem uma menor incidência de SHU nessa faixa etária sugerindo uma menor frequência de infecção por STEC (CAPRIOLI & TOZZI, 1998).

No Canadá, infecções por STEC são monitoradas desde 1990. Entre 1993 e 1995, 93% dos casos de infecções provocadas por STEC foram causadas pelo sorogrupo O157, mas vem ocorrendo um declínio da incidência em razão das atividades de controle implementadas, como boas práticas de fabricação dos alimentos e análise laboratorial.. O maior surto de infecção por STEC ocorreu no Canadá, foi notificado em 1991 entre os esquimós com 521 casos, sendo 22 casos de SHU e duas mortes (SPIKA et al.,1998).

Em Michigan, nos EUA, foi realizado estudo das STEC isoladas entre 2000 e 2005. Foram avaliados mais de 389 pacientes com STEC, 62% destes eram brancos e aproximadamente metade eram mulheres. A doença ocorreu em menos de 27% das pessoas com 10 anos de idade, 19% com 11 a 18 anos e 17% em pessoas com 19 a 23 anos de idade. Embora a frequência em pessoas maiores de 65 anos tenha sido menor (9%), esta faixa etária é hospitalizada com maior frequência que os menores de 18 anos, com diarreia sanguinolenta ou SHU. Cerca de 12 pacientes apresentaram SHU e dois estavam infectados com sorotipos não-O157: O103:H2 e O76:H7. Sete dos 12 pacientes com SHU estavam associados com cepas *stx*₂ apenas (MANNING et al.,2007).

No Japão, entre 1991 a 1995, ocorreram 29 surtos provocados por *Escherichia coli* O157:H7. Quatro destes surtos ocorreram em jardins de infância, seis ocorreram em escolas primárias e 19 ocorreram entre familiares (MICHINO et al.,1998).

Na Argentina, nos últimos 30 anos, a incidência de SHU em crianças de até quatro anos foi a maior do planeta. Casos de SHU neste país parecem ser 7 a 10 vezes mais altos do que se relata em outras áreas do mundo. Em grupo de crianças com SHU e com diarreia, 57% apresentaram infecções por STEC. Em crianças com diarreia sanguinolenta a percentagem de STEC foi de 38,9% e crianças com diarreia aquosa o agente foi detectado em 21% dos casos. Apenas 3% dos casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU) e 3% dos casos de diarreia foram relacionados com o sorotipo O157:H7 demonstrando a importância da STEC não pertencentes ao sorotipo O157:H7. O consumo de carne bovina na Argentina é considerado o maior do mundo (60Kg/habitante/ano). Neste país a carne bovina é a proteína de origem animal mais barata. As crianças iniciam o consumo de carne muito cedo, 20% aos cinco meses de idade e 80% delas consomem carne três vezes por semana. Além disso, 80% da carne consumida no país não passa por inspeção adequada. Estes dados justificam a alta incidência de infecções por STEC na Argentina (LOPEZ et al.,1998).

No Brasil, estudos realizados em São Paulo e no Paraná utilizando fezes de crianças com diarreia apontam frequência de STEC de aproximadamente 1%. Surtos associados à STEC ainda não foram confirmados no país (GUTH et al., 2002; TONI et al., 2004), porém existem relatos de alta prevalência de STEC em bovinos saudáveis (CERQUEIRA et al.,1999; PIGATTO,2004; IRINO et al.,2005; FARAH et al.,2007). Além disso, PANETO et al. (2007), ao estudar 50 queijos elaborados com leite não pasteurizado obtidos em supermercados da região centro oeste do Brasil, encontrou *Escherichia coli* em 96% e, destas, 6% pertenciam ao grupo produtor de toxina Shiga. Estes dados sugerem que este alimento pode servir como veículo de transmissão de STEC.

No Brasil, não há dados sistemáticos que possam indicar a situação da síndrome entre nós. No Estado de São Paulo, um estudo vem sendo conduzido pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) para determinar a situação dessa síndrome no Estado

e para estabelecer um ponto de partida para a introdução do sistema de vigilância da bactéria e da SHU. Mais informações sobre a epidemiologia desse patógeno no Brasil são necessárias para obter mais subsídios para a adoção de medidas de controle e diminuição do risco de infecção ao ser humano.

2.4 Manifestações Clínicas

A variedade de agravos à saúde provocados pela infecção por STEC inclui diarreia aquosa, colite hemorrágica, púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO & KAPER, 1998).

Os sintomas da colite hemorrágica iniciam com uma fase prodrômica 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, em pacientes sem febre. A doença, geralmente, é autolimitada, durando em média oito dias (RILEY et al.,1983, FDA, 1999). Estas características a distinguem da disenteria clássica causada por *Shigella sp.* ou *Escherichia coli* enteroinvasiva, que são caracterizadas por febre alta, toxemia, fezes com pouco sangue e muco contendo muitos leucócitos (GUAN et al.,2002).

A infecção por STEC, em alguns pacientes, progride para síndrome hemolítica urêmica que, embora acometa pessoas de todas as idades, afeta principalmente crianças, sendo neste grupo a mais importante causa de falência renal (NATARO & KAPER, 1998). A síndrome é caracterizada por um início súbito de anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda (KARMALI et al.,1983). Cinco a 10% dos pacientes com diarreia por STEC podem desenvolver SHU, podendo resultar em perda permanente das funções renais (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Dentre os pacientes com SHU, 3 a 5% morrem (MEAD & GRIFFIN, 1998), cerca de 30% dos que se recuperam podem apresentar lesões permanentes como insuficiência renal crônica, hipertensão e deficiência neurológica (TARR, 1995).

A púrpura trombocitopênica trombótica é muito semelhante à SHU em suas características clínico-patológicas. Porém, sinais neurológicos resultantes de coágulos

sanguíneos no cérebro e febre são mais evidentes na PTT, sendo mais comum em adultos que em crianças (KARMALI, 1989). Alguns indivíduos infectados com STEC podem permanecer assintomáticos, apesar da presença, em grande quantidade, tanto de microrganismos quanto de toxina nas fezes (BRIAN et al.,1992).

A infectividade da STEC é marcada pela característica de que apenas algumas células são necessárias para causar doença em seres humanos (GRIFFIN & TAUXE, 1991). A dose infectante é de apenas 10 bactérias, que não precisam multiplicar-se no alimento, sendo a contaminação original já suficiente para causar doença (WAHLSTRÖM, 2001). O regulamento do Serviço de Inspeção de Segurança Alimentar dos EUA declara que a presença de uma unidade formadora de colônia de *E. coli* O157:H7 em 25g constitui uma carne bovina de risco à saúde pública (JOHNSON et al.,1998).

Mesmo com várias pesquisas sendo desenvolvidas, não existe tratamento efetivo disponível para infecções causadas por STEC. O uso de antibióticos em pacientes com STEC não é indicado, pois aumenta o risco de desenvolvimento de SHU. A administração de antibiótico pode estimular a produção de toxina Shiga e a torna mais disponível à absorção agravando o quadro clínico (ZHANG et al.,2000; TARR et al.,2005).

2.5 Formas de Transmissão de STEC

O consumo de alimentos contaminados direta ou indiretamente por fezes bovinas é a principal via de transmissão da STEC. Nos EUA, desde 1982, mais de 100 surtos foram notificados, em 52% destes a via de transmissão foi alimento de origem animal, 16% foi a transmissão pessoa a pessoa, 14% por meio de alimentos de origem vegetal e frutas e 12% pela água (WHO, 1998).

A maioria dos surtos ocasionados por STEC está associado ao consumo de alimentos de origem bovina crus ou mal cozidos (MENG et al.,1998). No entanto outros alimentos como derivados de leite cru ou inadequadamente pasteurizado, frutas,

vegetais, produtos secos ou fermentados, estão relacionados a doenças causadas por STEC. A veiculação também foi relatada por alface, brotos de rabanete, alface e feijão, salada com molho de maionese, salada de ervilha, molho de frutos do mar, suco de maçã não pasteurizado, batata, rosbife, salame, carne seca e atum cru fatiado (PATON & PATON, 1998; FUKUSHIMA et al., 1999; SAFARIKOVA & SAFARIK, 2001; HUSSEIN & SAKUMA, 2005).

A contaminação de carcaças bovinas no processo de abate com fezes de animais portadores associado ao consumo de produtos e subprodutos cárneos, sem apropriado processamento térmico, permite a manutenção do microrganismo no interior da carne (HART et al., 1997).

No Reino Unido foi confirmado pela primeira vez o leite não pasteurizado como fonte de *E.coli* O157 (CHAPMAN et al., 1993). Posteriormente muitos relatos indicaram a associação entre consumo de leite não pasteurizado e a colite hemorrágica ou a SHU (KIRK et al., 1997). A habilidade das STEC em invadir células epiteliais da glândula mamária dos bovinos, pode ser um mecanismo importante na sua patogênese. Esta situação nos apresenta uma rota em que o leite cru pode potencialmente ser contaminado, servindo de fonte de contaminação para equipamentos e fonte de infecção para trabalhadores (MATTHEWS et al., 1997). Mesmo o leite tratado pode ser contaminado, se a pasteurização for inadequada ou ocorrer contaminação pós-pasteurização. Surtos e casos esporádicos foram relatados após o consumo de queijo (CDC, 2000) e iogurte (MORGAN et al., 1993) contaminados com STEC. Além disso, animais que saem do período de produção de leite são abatidos para o aproveitamento de sua carne e, esta situação também representa importante risco à saúde (FAITH et al., 1996).

Segundo a Food and Drug Administration (FDA), dos EUA, órgão que regulamenta os padrões sanitários de alimentos e a utilização de medicamentos no país, os alimentos com pH inferior a 4,6 são considerados de menor risco na transmissão de patógenos de origem alimentar. Contudo, surtos recentes envolvendo STEC têm revelado que esse organismo pode manter-se viável em alimentos com baixo pH, como suco de maçã (pH entre 3,7 a 3,9) (RIBEIRO et al., 1999).

2.6 Métodos Diagnósticos para Detecção de STEC

O principal impasse na identificação e caracterização da STEC é a predominância da *Escherichia coli* comensal na microbiota fecal da amostra a ser analisada. Os pontos importantes a serem estabelecidos são: detectar a STEC, presente em menor quantidade na amostra, e isolar, identificar e caracterizar o isolado. Além disso, a análise deve ser rápida e eficiente para auxiliar a identificação do reservatório, do surto e para iniciar rapidamente o tratamento de suporte ao paciente (BETTELHEIM & BEUTIN, 2003).

Vários métodos para detecção de STEC vem sendo desenvolvidos. Os métodos microbiológicos tradicionais, além de demorados, são inadequados para a detecção de pequeno número de microrganismo-alvo em presença da microbiota interferente abundante (VIEGAS, 1996). Assim, a detecção de STEC deve ser baseada na pesquisa das toxinas Shiga ou dos genes que as codificam (WHO, 1998).

- Ensaio de Citotoxicidade em Cultura Celular

O ensaio de citotoxicidade em cultura celular deve ser realizado com células Vero, que são mais sensíveis às toxinas Shiga. Esse método é utilizado como triagem e pode ser aplicado a filtrados de fezes, extratos de cultivos microbianos e colônias isoladas. O ensaio de citotoxicidade é muito sensível, mas não é específico como os métodos moleculares. Assim a positividade desta metodologia deve ser confirmada por um método mais específico como, por exemplo, a neutralização com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos (WHO, 1998). Este ensaio é bastante sensível, porém demorado e trabalhoso e necessita de cultivo celular que o torna pouco prático para os laboratórios de rotina (BETTELHEIM & BEUTIN, 2003).

- Ensaio Imunológicos

Vários métodos imunológicos como ensaios imunoenzimáticos para detecção de STEC foram desenvolvidos. Diferente da cultura celular, muitos ensaios imunológicos estão disponíveis comercialmente em “kits” prontos para uso, o que é uma vantagem para a rotina laboratorial, mas apresentam custo elevado (BETTELHEIM & BEUTIN, 2003).

O sistema de separação imunomagnética é um tipo de ensaio imunológico e baseia-se em duas ações principais: a captura da célula alvo por ligação imunológica utilizando imunoglobulinas específicas para detecção do sorotipo, ligadas a microesferas magnéticas e a posterior precipitação e separação por ação de forças magnéticas. Essas duas etapas levam à separação específica de células bacterianas permitindo a posterior concentração e purificação do microrganismo-alvo (LIU & LI, 2002). Apesar da grande eficiência este método está disponível para poucos sorogrupos de *Escherichia coli* (O157, O111 e O26) (DE BOER & HEUVELINK, 2002).

- Ágar MacConkey Sorbitol (SMAC)

O Ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) é o meio comumente utilizado para detecção de STEC do sorotipo O157:H7 (CHAPAMN et al.,1991; CUBBON, 1996). O SMAC diferencia do Ágar MacConkey tradicional devido a substituição da lactose pelo sorbitol. O sorotipo O157:H7 não fermenta o sorbitol e este é identificado por meio de colônias transparentes no SMAC após 24h de incubação, enquanto a maioria das outras *E. coli* fermenta o sorbitol (DUFFY et al.,2001).

A inclusão do carboidrato ramnose e do antibiótico cefixime no SMAC, denominado CR-SMAC, auxilia a inibição de outros organismos que também não fermentam o sorbitol. Além disso, o cefixime inibe *Proteus* spp (CHAPMAN et al.,1991). Outra modificação realizada no SMAC inclui além do cefixime o telurito de potássio, criando o meio CT-SMAC (FUKUSHIMA & GOMYODA,1999). Este inibe a multiplicação

de outras *Escherichia coli*, permitindo a multiplicação apenas do sorotipo O157:H7 (ZADIK et al.,1993).

- Ensaio Sorológico

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 (ACHA & SZYFRES, 2001; 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 as STEC nos Estados Unidos e o mais frequentemente 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.

Embora a tipagem sorológica seja amplamente utilizada e existam associações entre sorotipos e virulência, esta técnica isoladamente não é adequada para caracterizar estirpes de *E. coli* como patogênicas (FORBES et al.,2002). Uma vez que as amostras diarreogênicas apresentam, em geral, as mesmas características bioquímicas do restante da espécie, seu isolamento e identificação baseiam-se, sobretudo na presença de fatores de virulência associados a cada categoria, detectáveis principalmente através de métodos moleculares (NATARO & KAPER, 1998).

- Técnicas Moleculares para diagnósticos de STEC

Métodos baseados na análise de DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizados com sucesso no diagnóstico da STEC. Regiões específicas dos genes *stx* são selecionadas e oligonucleotídeos complementares são utilizados para amplificar fragmentos dos genes (BETTELHEIM & BEUTIN, 2003). Uma variedade de sistemas são utilizados por diferentes laboratórios, sendo que 14 foram comparados (BASTIAN et al.,1998) e a medida que aumenta o número de variantes das toxinas, a variedade e o número de sistemas de PCR também aumentam (BETTELHEIM & BEUTIN, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos principais métodos moleculares utilizados para detecção de STEC (PARK et al.,1999). Esta técnica apresenta como vantagens a especificidade e sensibilidade bem como a rapidez na sua execução (PATON & PATON, 1998). Por outro lado apresenta como desvantagem a presença de inibidores da reação presentes na própria amostra e a facilidade de contaminação durante o processo (BRIAN et al.,1992). Além disso, a seqüência a ser escolhida para o iniciador (“primer”) deve conter uma região bastante conservada para que não ocorra a diminuição na eficiência do anelamento (PATON & PATON, 1998). Variações da PCR como PCR multiplex, PCR em Tempo Real também são utilizados. A maioria destas técnicas é usada para determinar a presença de STEC na amostra sem a necessidade do isolamento do microrganismo (BETTELHEIM & BEUTIN, 2003).

Os métodos para a tipagem de gene *stx* baseados em análise de ácidos nucléicos incluem, principalmente, os ensaios com endonucleases de restrição. As análises estão fundamentadas no uso de enzimas produzidas por bactérias e denominadas endonucleases de restrição. Estas enzimas cortam o DNA em seqüências específicas compostas por quatro a seis pares de base. Após o tratamento com estas enzimas, ocorre a formação de fragmentos, cujos tamanhos são determinados via eletroforese. A separação dos fragmentos é obtida por eletroforese em gel de agarose, e a visualização é realizada por coloração do gel com brometo de etídio. A diferença (polimorfismo) no tamanho dos fragmentos de DNA gerados pelo tratamento com

endonucleases de restrição é denominada “polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição” ou RFLP. Esta técnica pode ser aplicada em estudos epidemiológicos e permite a identificação de subtipos de Stx (KONEMANN et al., 2001). Existem ainda técnicas que, além de identificar os subtipos já descritos, propiciam a detecção de novas variantes como é o caso do sequenciamento.

O sequenciamento é um processo molecular que determina a sequência real de nucleotídeos num fragmento de DNA. Existem vários métodos disponíveis, e cada um apresenta vantagens e desvantagens. Um dos mais utilizados é o chamado “método dideoxi” conhecido também como de “terminadores de cadeia” descritos por Sanger. O sequenciamento permite comparações entre seqüências e permite a detecção de novas variantes Stx1 e Stx2 (MICKLOS et al., 2005).

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) oriundos de fezes de bovinos de corte do Estado do Paraná.

Objetivos Específicos

- Detectar os principais fatores de virulência (genes *stx*, *eae*, *hlyA* e *saa*),
- Determinar os sorotipos de STEC isolados,
- Determinar o perfil de resistência a diferentes agentes antimicrobianos,
- Determinar a viabilidade da STEC em 10 dias no queijo Minas Frescal,
- Determinar a sequência genética parcial da toxina Stx2 produzida pela STEC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Isolados de STEC previamente obtidos por PIGATTO (2004) foram selecionados a partir de 563 colônias de *Escherichia coli* isoladas de culturas de 193 amostras de fezes bovinas coletadas em matadouro frigorífico situado na região metropolitana de Curitiba, Paraná.

Nesse estudo anterior, as amostras fecais foram colhidas com swab retal no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003. O transporte das amostras foi realizado em meio Cary-Blair, a cultura em Ágar MacConkey-Sorbitol (SMAC) foi incubada a 37°C por 24 horas. Foram selecionadas em média 10 colônias sorbitol positivo e negativo que foram inoculadas nos meios EPM (Escola Paulista de Medicina) e MILI (motilidade, indol e lisina). Colônias com características de *Escherichia coli* foram inoculadas em Ágar TSA (OXOID) e estocadas a temperatura ambiente.

As colônias foram avaliadas quanto a capacidade de produzir toxina Shiga, através do ensaio de citotoxicidade em células Vero segundo KARMALI et al.,(1985) e quanto à presença dos genes *stx* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) segundo LIN et al.,(1993).

4.2. Determinação dos Sorotipos de STEC

A caracterização antigênica das STEC foi realizada no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) utilizando os antisoros somáticos (O1-O181) e flagelares (H1-H56) preparados com cepas de referência obtidas junto ao “International Reference Centre for *Escherichia / Klebsiella*”, Copenhagen, Dinamarca. A sorotipagem foi realizada de acordo com EWING, (1986).

4.3. Detecção da Expressão da Toxina Shiga Através de Imunoensaio

A expressão de Stx nas STEC foi avaliada utilizando o kit comercial VTEC-RPLA (Denka-Seiken, Japan). O VTEC-Screen detecta Stx1 e Stx2 em culturas mistas e isolados de *Escherichia coli* por aglutinação passiva reversa. Este ensaio foi realizado segundo instruções do fabricante. Foram realizadas diluições até 1:16 e títulos inferiores a 1:4 foram considerados negativos. A cepa STEC O157:H7 EDL 933 foi utilizada como controle positivo e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle negativo para a produção de toxina Shiga.

4.4. Caracterização Genotípica das STEC

4.4.1. PCR – Multiplex

O DNA foi extraído pelo método da fervura segundo OLSVICK & STROCKBINE (1993). A caracterização genotípica das STEC foi realizada quanto à presença ou ausência dos genes *stx*₁, *stx*₂, *ehxA*, *eae* e *saa* de acordo com PATON & PATON (2002). A sequência dos iniciadores está descrita na TABELA 2.

TABELA 1 – Iniciadores utilizados na PCR multiplex para amplificação dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* e *saa*..

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Tamanho do Amplicon
<i>saa F</i>	CCTCACATCTTCTGCAAATACC	119pb
<i>saa R</i>	GTTGTCCTGCAGATTTTACCATCCAATGGACATG	
<i>stx</i> ₁ <i>F</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180pb
<i>stx</i> ₁ <i>R</i>	AGAACGCCCCACTGAGATCATC	
<i>stx</i> ₂ <i>F</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255pb
<i>stx</i> ₂ <i>R</i>	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
<i>eaeA F</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384pb
<i>eaeA R</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>ehxA F</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534pb
<i>ehxA R</i>	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

* Fonte PATON & PATON (1998, 2002).

As reações foram realizadas em volume final de 25µL, contendo 3µL de DNA; 0,25µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen 5U/µL); 2,5 µL de tampão 10X para Taq (Invitrogen); 0,75µL de MgCl₂ 50mM; 2µL da mistura dos iniciadores (300nM cada); 1,0µL de dNTP (Eppendorf) 5mM. O programa utilizado foi o seguinte: 1 ciclo a 94°C durante 4 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 64°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguido de 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. A amplificação das amostras foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Foram utilizadas STEC O157:H7 EDL933 como controle positivo e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle negativo.

4.4.2. Detecção dos Produtos de PCR

Para a detecção dos produtos de PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose (BIO RAD) a 2% em TBE (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM) (AUSUBEL et al.,1999). As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema de eletroforese horizontal, a 36V durante 3 horas. Os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídio 0,5µg/mL, visualizados em transiluminador ultravioleta (Ultralum) e as imagens registradas com câmera digital Sony W7.

4.4.3. Ensaios de PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) foi utilizada para identificar as variantes genéticas de *stx*₂. No ensaio de PCR-RFLP fragmentos dos genes *stx*₂ foram tratados com endonucleases de restrição gerando produtos que permitem caracterizar alelos de *stx*₂, como descritos em DE BAETS et al.,(2004).

Para a subtipagem das variantes, foi realizado inicialmente um ensaio de PCR para amplificação dos genes do tipo *stx*₂. Foram utilizados na reação 25µL da mistura contendo 10µL de DNA, uma unidade de Taq DNA platinum (Invitrogen), 2,5µL de tampão de Taq 10X, 0,75µL de MgCl₂ 50mM, 1,0µL de dNTP 5mM e 1,0µL dos iniciadores oli320b (5'GGTCACTGGTTCTGAATCCAGTAC3') e oli321 (5'GGGATCCTGAATTGTGACACAGATTACACTTGTAC3') a 25pmol/µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient – Eppendorf, utilizando o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C durante 50 segundos; 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; seguidos de 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. A presença dos produtos de amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% (DE BAETS et al.,2004).

A digestão do DNA com as enzimas de restrição foi realizada em volume final de 20µL, utilizando 10µL do produto de PCR e uma unidade das enzimas *Hind*II, *Acc*I, *Pvu*I e *Hae*III (Fermentas) em tampão fornecido pelo fabricante. A reação foi incubada por 12

horas a 37°C. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, a 30V durante 4 horas. A interpretação do padrão de bandas gerada foi feita como indicado nas TABELAS 3 e 4.

TABELA 2 – Perfil de restrição de variantes *stx*₂ obtido com as enzimas *HincII* e *AccI*, segundo DE BAETS et al.,(2004).

Genes <i>stx</i>	<i>HincII</i> (pb)	Genes <i>stx</i>	<i>AccI</i> (pb)
<i>stx</i> ₂	50, 120, 275, 1000	<i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2a} / <i>vhc/vhb</i> / <i>OX3a/OX3b</i> / <i>O111/O48</i>	250, 580, 700
<i>stx</i> _{2a} / <i>vha</i> / <i>OX3b</i>	120, 350, 1000	<i>vha</i>	700, 800
<i>vhc/vhb</i>	550, 1000	<i>O118</i>	250, 1078
<i>OX3a/O111/O118</i>	120, 1200		
<i>O48</i>	220, 275, 1000		

TABELA 3 – Perfil de restrição de variantes *stx*₂ obtido com as enzimas *PvuI* e *HaeIII*, segundo DE BAETS et al.,(2004).

Genes <i>stx</i>	<i>PvuI</i> (pb)	Genes <i>stx</i>	<i>HaeIII</i> (pb)
<i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2a} / <i>OX3b</i>	450, 1078	<i>stx</i> ₂ / <i>O48</i>	30, 90, 400, 500, 550
<i>vha</i>	1400	<i>stx</i> _{2a} / <i>vha</i> / <i>vhb/vhc</i>	30, 90, 200, 250, 400, 550
<i>vhb/vhc</i>	140, 1250	<i>OX3a/O111</i>	140, 200, 1000
<i>OX3a/O111/O118</i>	120, 280, 1078,	<i>OX3b</i>	30, 90, 200, 250, 850
<i>O48</i>	140, 250, 1078	<i>O111</i>	30, 200, 250, 400, 600

4.5. Sequenciamento de DNA

4.5.1. Amplificação dos Genes do Tipo *stx*₂ por PCR

A amplificação dos genes tipo *stx*₂ foi realizada utilizando os iniciadores propostos por DE BAETS et al.,(2004) (item 4.4.3) gerando fragmentos de aproximadamente 1400pb contendo todo o operon *stx*₂.

4.5.2. Purificação do Produto de PCR

Antes de proceder a reação de sequenciamento, os produtos de PCR foram tratados com as enzimas EXO I (Exonuclease I marca USB -10U/μL) e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase marca USB - 1U/μL) para eliminar restos de iniciadores e dNTP. Dez microlitros do produto de PCR foram adicionados de 1μL de EXO e 0,5μL de SAP e incubados durante uma hora a 37°C e 20 minutos a 80°C.

4.5.3. Reação de Sequenciamento

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxirribonucleotídeos fluorescentes (SANGER et al.,1977 modificado). A reação foi realizada em volume final de 10μL contendo 5pmol do iniciador específico, 6μL do produto de PCR purificado e 3μL do reagente de sequenciamento DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amershan Biosciences). O programa utilizado para a reação de sequenciamento foi: 30 ciclos de 96°C por 30 segundos, 55°C com as seqüências oli320b (5'GGTCACTGGTTCGAATCCAGTAC3') ou oli321 (5'GGGATCCTGAATTGTGACACAGATTACACTTGTTAC3') (DE BAETS et al.,2004). Os iniciadores *stx*₂F, *stx*₂R (PATON & PATON,1998b) e linF, linR (LIN et al.,1993)

também foram utilizados para o sequenciamento. O produto da reação de sequenciamento foi tratado com isopropanol (60µL) e água Milli Q (30µL), homogeneizado e então mantido a temperatura ambiente durante 30 minutos e centrifugado a 14.000rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado foi lavado por duas vezes com 250µL de etanol 70% (preparado na hora), seco e aplicado no Seqüenciador Automático de DNA modelo ABI Prism 377 DNA Sequencer da Applied Biosystems. As seqüências foram analisadas com os programas Bio Edit Sequence Alignment Editor (HALL,1999), BLASTN (ALTSHUL et al.,1997) e CLUSTAL X (JEANMOUGIN et al., 1998).

4.6. Perfil de Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado utilizando a técnica de disco difusão segundo as recomendações do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratories Standards 2000). As cepas de STEC foram cultivadas em meio TSA durante 18 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Três a cinco colônias foram suspensas em solução salina estéril a 0,85% até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 na escala de Mac Farland (aproximadamente 10^8 microrganismos/mL). A suspensão foi inoculada em placas de ágar Muller-Hinton, com o auxílio de swab estéril, por toda a superfície do meio, para a obtenção de crescimento bacteriano confluyente. Discos impregnados com os antimicrobianos selecionados (marca CECON) foram depositados nas placas com o auxílio de uma pinça estéril. Os seguintes antimicrobianos foram testados: Ácido Nalidíxico (NAL) 30 µg, Ampicilina (AMP) 10µg, Cefalotina (CFL) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5µg, Cloranfenicol (CLO) 30µg, Estreptomicina (EST) 10µg, Gentamicina (GEN) 10µg, Imipenem (IPM) 10 µg, Nitrofurantoína (NIT) 300 µg, Sulfazotrim (SUT) 25 µg, Tetraciclina (TET) 30µg,. As placas foram incubadas a 37°C por 16 a 20 horas. Após o período de incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido e os resultados foram interpretados de acordo com as normas do NCCLS.

4.7. Viabilidade de isolados de STEC em queijo minas frescal.

4.7.1. Determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes no Leite Pasteurizado.

As análises para determinação de coliformes totais e termotolerantes no leite pasteurizado utilizado como matéria prima foram realizadas seguindo a metodologia do Compêndio de Métodos para Exames Microbiológicos de Alimentos da Associação Americana de Saúde Pública (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER; 1992).

4.7.2. Isolados de STEC utilizados para inoculação no leite.

Dezesseis cepas de STEC não-O157, previamente isoladas de fezes de bovinos adultos aparentemente saudáveis (PIGATTO, 2004), carreando genes do tipo *stx*₂, foram utilizadas, separadamente, para contaminar alíquotas de leite usadas na produção de queijo Minas Frescal. As cepas de STEC foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas e colônias isoladas foram suspensas em solução salina fisiológica estéril até atingir turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland o que corresponde a aproximadamente 10⁸UFC/mL. As suspensões preparadas com cada uma das cepas isoladamente foram utilizadas para contaminar alíquotas de leite distintas que foram então empregadas na fabricação de queijos. Cada amostra de leite foi contaminada com um isolado diferente de STEC.

4.7.3. Processo de Produção do Queijo Tipo Minas Frescal

Para o processamento do queijo tipo Minas Frescal foram utilizados os seguintes produtos: leite tipo “A” pasteurizado pelo processo HTST (“High Temperature, Short Time”, 75°C por 20 segundos), proveniente da Granja Leiteira da FCAV - Unesp -

Campus de Jaboticabal, coalho HA-LA BIOTEC (Christian-Hansen) 1:20000, obtido por fermentação, contendo 100% quimosina tipo A, CaCl_2 a 50% (Base Química) e formas plásticas estéreis.

As alíquotas do leite foram aquecidas a 35°C e adicionadas 10mL de uma das suspensões de STEC, 25mL de solução de CaCl_2 a 50% e do coalho comercial, na proporção indicada pelo fabricante. A mistura foi homogeneizada e então mantida em repouso por aproximadamente 40 minutos até a formação do coágulo. Após este período foi retirado o soro presente e a salga realizada com NaCl diluído a 2%. Os queijos foram acondicionados em embalagens plásticas estéreis e armazenados sob refrigeração a 4°C por um período de 10 dias (BRASIL, 1997). Os queijos foram preparados em duplicata a partir de novas alíquotas de leite e suspensões de STEC.

4.7.4. Detecção de STEC a partir do queijo elaborado.

Para verificar a viabilidade das cepas de STEC, alíquotas de 25g de cada queijo foram colhidas após o 1º, 2º, 4º, 6º e 10º dias da fabricação e cultivadas em 225mL de água peptonada durante 24 horas a 37°C. Após este período 0,1mL de cada cultura foi semeado em ágar MacConkey e incubado por 24 horas a 37°C. O crescimento foi utilizado para a extração do DNA segundo OLSVICK & STROCKBINE (1993). A detecção de STEC foi realizada utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) tendo como alvo o gene *stx*₂. A reação foi realizada segundo CHINA et al.,(1996), utilizando os iniciadores *stx*₂F 3'TGGGTTTTTCTTCGGTATC5' e *stx*₂R 5'GACATTCTGGTTGACTCTCTT3' que amplificam um fragmento de 807pb dos genes *stx*₂. Como controles positivo e negativo foram utilizados a STEC O157:H7 EDL 933 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente.

5. RESULTADOS

Do total de 190 amostras de fezes do reservatório bovino analisadas, 70 (37%) foram positivas para STEC. A maioria das STEC isoladas eram sorbitol positivo. As amostras de três animais apresentaram mais de uma estirpe de STEC. Estas estirpes pertencem a diferentes sorotipos e carregam marcadores de virulência distintos, produzindo assim um total de 74 STEC.

5.1. Sorologia

As STEC foram classificadas em 34 diferentes sorotipos de acordo com a reação sorológica (TABELA 5). Do total de amostras testadas nenhuma apresentou positividade para o sorogrupo O157. Os sorotipos mais freqüentes foram ONT:H7 (10%), O22:H8, O22:H16 (7%) e ONT:H21 (7%). Em cinco amostras não foi possível à identificação sorológica com os soros disponíveis.

Importante ressaltar, que os sorotipos O10:H42, O17:H41, O41:H2, O98:H41, O113:H12, O117:H8, O124:H11, O159:H21, O175:H21, O179:H8, O181:H4 e ONT:H8 até então, não tinham sido descritos na literatura em associação com STEC. Por sua vez, os sorotipos O22:H8, O113:H21, O174:H21, ONT:H- e OR:H10 encontrados neste trabalho já foram associados a casos graves da síndrome hemolítica urêmica.

TABELA 4 – Sorotipos de STEC identificados e suas respectivas frequências em fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.

Sorotipo	Número de STEC
O6:H34	1
O10:H42	3
O17:H41	1
<u>O22:H8</u>	5
O22:H16	5
O41:H2	1
O74:H42	2
O79:H-	1
O82:H8	2
O98:H41	1
O110:H2	2
O113:H12	1
<u>O113:H21</u>	3
O117:H8	1
O124:H11	1
O159:H21	1
<u>O174:H21</u>	3
O175:H21	1
O178:H19	2
O179:H8	1
O181:H4	1
ONT:H2	3
ONT:H7	7
ONT:H8	2
ONT:H10	1
ONT:H12	2
ONT:H16	3
ONT:H21	5

ONT:H25	2
ONT:H38	1
ONT:H41	1
<u>ONT:H-</u>	1
<u>OR:H10</u>	1
OR:H18	1

*Os sorotipos em negrito ainda não foram descritos na literatura associados à STEC.

** Os sorotipos em negrito e sublinhados estão associados a casos graves de síndrome hemolítica urêmica (<http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm>). NT: não tipável e R: rugosa.

5.2. Expressão da Toxina Shiga

Sessenta e cinco (89%) cepas de STEC reagiram positivamente no ensaio VTEC-RPLA (TABELA 6). Três cepas foram identificadas como produtora de toxina Stx1 pelo ensaio VTEC-RPLA e foram detectadas na PCR multiplex contendo o gene *stx*₂. Além disso, nove STEC que apresentaram resultado negativo no ensaio VTEC-RPLA foram positivas na PCR multiplex para *stx*₁ e *stx*₁, *stx*₂ ou *stx*₁.

TABELA 5 – Total de amostras com as características do ensaio VTEC-RPLA e da PCR Multiplex provenientes de fezes de bovinos oriundos do Estado do Paraná.

Número de Amostras	Multiplex	VTEC-RPLA
29	<i>stx</i> ₂	Stx2
5	<i>stx</i> ₁	Stx1
4	<i>stx</i> _{1,2}	NR
28	<i>stx</i> _{1,2}	Stx1,2
3	<i>stx</i> ₂	Stx1
2	<i>stx</i> ₂	NR
3	<i>stx</i> ₁	NR

NR: não reagente

5.3. Caracterização Genotípica das STEC

Os marcadores de virulência foram encontrados em 11 diferentes combinações, o mais freqüente foi *stx*₂ (27%), *stx*₁ *stx*₂ e *stx*₁ *stx*₂ *ehxA* *saa* (16% cada). O gene *eae* foi encontrado em somente uma cepa e em associação com *stx*₁ e *ehxA*.

O gene *saa* foi encontrado em apenas 28 cepas (38%). O gene *ehxA* foi encontrado em 32 cepas (44%) e 22 destas apresentaram positividade para o gene *saa*, indicando uma significativa associação ($P < 0,05$) entre estes genes de origem plasmidial (TABELA 7 e FIGURA 1).

TABELA 6 – Expressão da toxina Shiga e presença de genes de virulência nas STEC estudadas, isoladas de fezes de bovinos de corte provenientes do Estado do Paraná.

Isolados	VTEC-RPLA (Título)	PCR-Multiplex
CP-10	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂ <i>saa</i>
CP-11	Stx2 (1:8)	<i>stx</i> ₂
CP-13	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂
CP-14	Stx1 (1:16)	<i>stx</i> ₁ <i>ehxA</i> <i>saa</i>
CP-16	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂ <i>saa</i>
CP-17	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂
CP-18	NR	<i>stx</i> ₁ <i>stx</i> ₂
CP-21	Stx2 (1:8)	<i>stx</i> ₂
CP-22	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₁ <i>stx</i> ₂ <i>ehxA</i> <i>saa</i>
CP-24	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂ <i>ehxA</i>
CP-26	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₁ <i>stx</i> ₂ <i>ehxA</i> <i>saa</i>
CP-27	NR	<i>stx</i> ₁ <i>stx</i> ₂
CP-28	Stx1 Stx2 (1:16/1:8)	<i>stx</i> ₁ <i>stx</i> ₂ <i>ehxA</i> <i>saa</i>
CP-29	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂
CP-31	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂
CP-32	Stx2 (1:8)	<i>stx</i> ₂
CP-33	Stx2 (1:16)	<i>stx</i> ₂ <i>ehxA</i> <i>saa</i>

CP-33a	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-37	Stx1 Stx2 (1:16/1:4)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-39	Stx1 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-41	Stx1 (1:8)	<i>stx₁ ehxA saa</i>
CP-42	Stx2 (1:16)	<i>stx₂ ehxA saa</i>
CP-43	Stx2 (1:16)	<i>stx₂ ehxA saa</i>
CP-44	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-44a	Stx1 Stx2 (1:16/1:8)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-46	Stx2 (1:16)	<i>stx₂ ehxA saa</i>
CP-47	Stx2 (1:8)	<i>stx₂ saa</i>
CP-50	Stx1 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-50a	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-52	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-53	Stx2 (1:16)	<i>stx₂ saa</i>
CP-54	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-61	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-66	Stx2 (1:8)	<i>stx₂</i>
CP-67	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-68	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-69	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-70	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-72	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-74	Stx1 Stx2 (1:16/1:8)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-75	Stx1 Stx2 (1:16/1:8)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-77	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ saa</i>
CP-78	Stx1 Stx2 (1:16/1:8)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-86	NR	<i>stx₁ stx₂ saa</i>
CP-87	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-88	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-90	Stx1 (1:16)	<i>stx₁ eaeA ehxA</i>

CP-103	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-104	Stx1 (1:16)	<i>stx₁ ehxA saa</i>
CP-105	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-112	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-113	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>
CP-114	Stx2 (1:16)	<i>stx₂ ehxA saa</i>
CP-116	Stx2 (1:4)	<i>stx₂</i>
CP-119	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-122	NR	<i>stx₂ ehxA saa</i>
CP-123	NR	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-124	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-137	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ saa</i>
CP-151	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-152	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-158	NR	<i>stx₁</i>
CP-162	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA</i>
CP-163	NR	<i>stx₁</i>
CP-168	Stx2 (1:8)	<i>stx₂</i>
CP-169	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-170	Stx1 (1:16)	<i>stx₁ stx₂</i>
CP-172	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-173	Stx1 (1:4)	<i>stx₁</i>
CP-174	NR	<i>stx₂</i>
CP-175	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-176	NR	<i>stx₁ ehxA saa</i>
CP-178	Stx2 (1:16)	<i>stx₂</i>
CP-179	Stx1 Stx2 (1:16)	<i>stx₁ stx₂ ehxA saa</i>

NR : não reagente

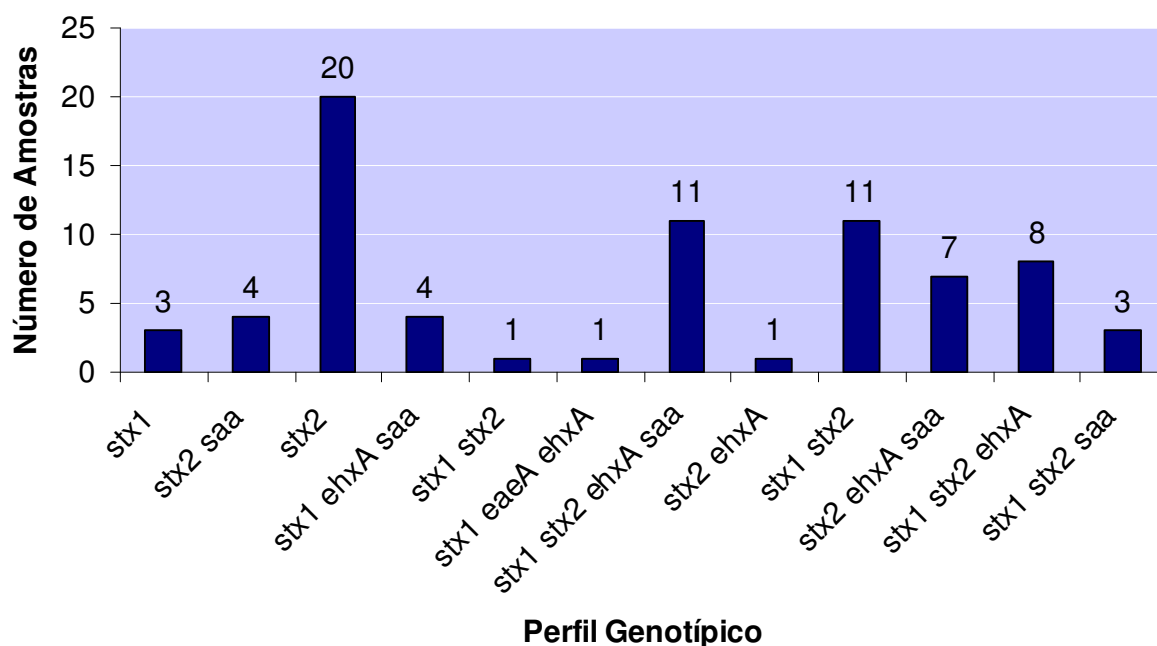


FIGURA 2 – Perfis genotípicos identificados nas Cepas de STEC isoladas de fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.

5.4. Subtipagem do Gene *stx*₂

A pesquisa de variantes de *stx*₂ foi realizada por PCR-RFLP segundo DE BAETS et al. (2004). A combinação das enzimas PVUII, HaeIII, HincII e Accl utilizadas nesta metodologia permitiu discriminar oito padrões de *stx*₂.

Do total de 74 STEC isoladas, 66 apresentaram o gene *stx*₂. Dezesesseis STEC confirmadas pela PCR multiplex não amplificaram com os iniciadores OLI recomendados por DE BAETS et al. (2004), o que não permitiu determinar o alelo presente nestas amostras. Três estirpes testadas provavelmente apresentam mais de dois genes o que não permitiu sua determinação por meio deste ensaio. Além disso, oito amostras não apresentaram o padrão estipulado por este sistema. Foram detectados oito subtipos nas demais cepas: *stx*_{2OX3a/O111}; *stx*₂; *stx*_{2c}; *stx*_{2(vha)}; *stx*_{2(vhb)};

stx_{2OX3b}; *stx_{2vnb/vhc}* e *stx_{2O48}*. Os genes que apresentaram maior frequência foram: *stx₂*; *stx_{2c}*. Os resultados obtidos estão indicados na TABELA 8, FIGURAS 2, 3 e 4.

TABELA 7 – Frequência de subtipos de *stx₂* identificados nas amostras de STEC isoladas de fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.

Subtipo	Número de STEC	Frequência de STEC
<i>stx_{2OX3a/O111}</i>	7	18%
<i>stx₂</i>	8	20,5%
<i>stx_{2c}</i>	9	23%
<i>stx_{2(vha)}</i>	6	15%
<i>stx_{2(vhb)}</i>	3	7,7%
<i>stx_{2OX3b}</i>	2	5%
<i>stx_{2vnb/vhc}</i>	1	3%
<i>stx_{2O48}</i>	3	7,7%

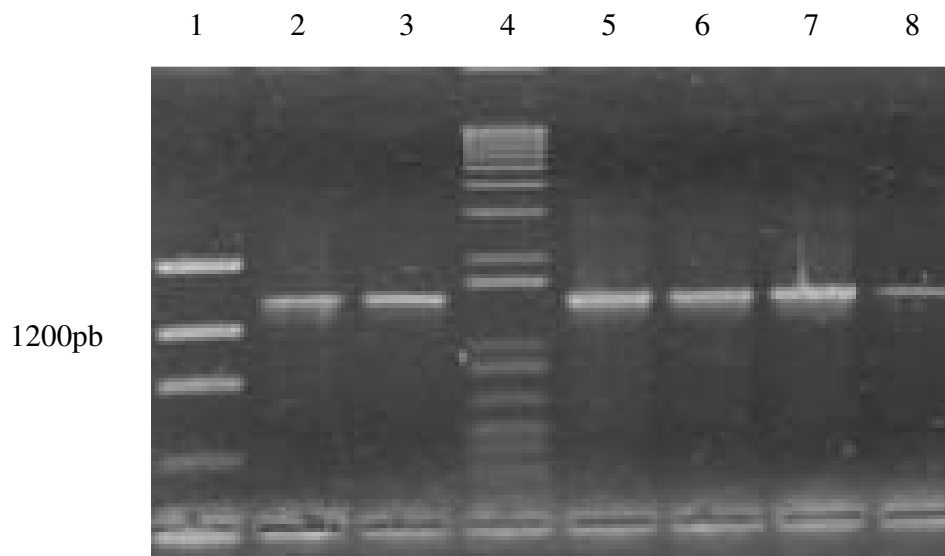


FIGURA 3 – Representação em gel de agarose (2%) contendo produtos de PCR para detecção do gene *stx*₂ (amplificação de 1400pb) com o iniciador OLI (DE BAETS et al. 2004). Linha 1 - marcador de massa molecular Low Mass (Fermentas). Linhas 2,3,5,6,7 e 8 - amostras CP11, CP13, CP21, CP29, CP32, CP54 contendo gene *stx*₂. Linha 4 - marcador de massa molecular de 2kb (Fermentas).

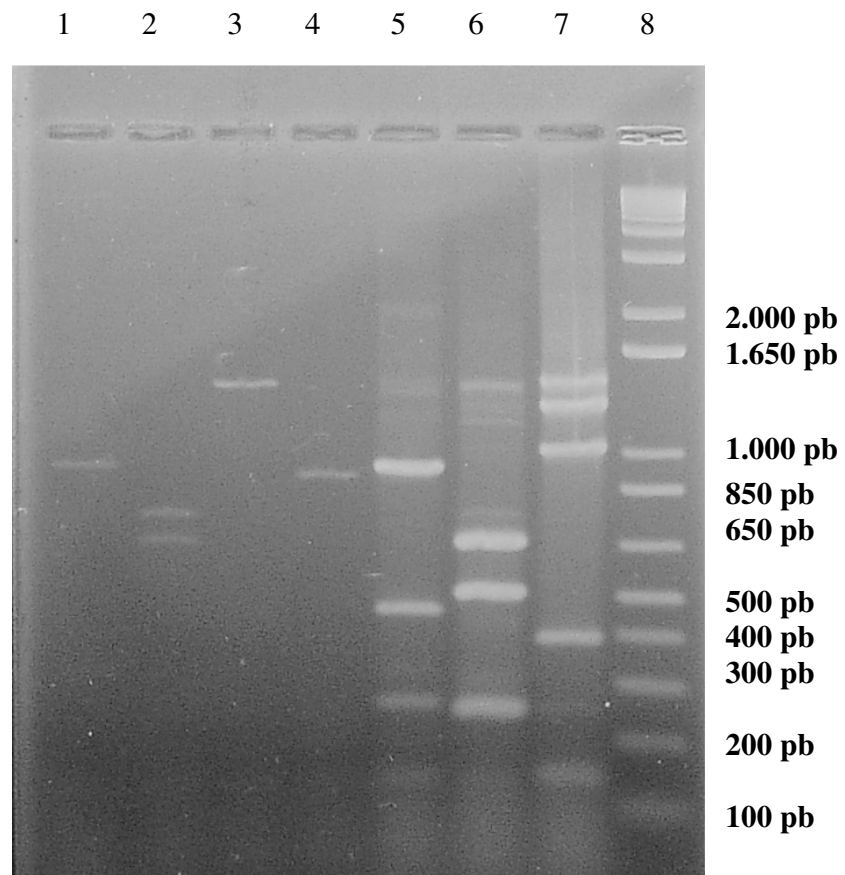


FIGURA 4 – PCR-RFLP do gene *stx*₂ mostrando perfil compatível com *stx*_{2OX3a/O111} e *stx*₂. Linha 1 - perfil de *stx*_{2OX3a/O111} digerido com a enzima *HincII*. Linha 2 - perfil de *stx*_{2OX3a/O111} digerido com *Accl*. Linha 3 - perfil de *stx*_{2OX3a/O111} digerido com *PVU* I. Linha 4 - perfil de *stx*_{2OX3a/O111} digerido com *HaeIII*. Linha 5 - perfil de *stx*₂ digerido com *HincII*. Linha 6 - perfil de *stx*₂ digerido com *Accl*. Linha 7 - perfil de *stx*₂ digerido com *PVU* I. Linha 8 - marcador de Massa Molecular 2 Kb (Invitrogen).

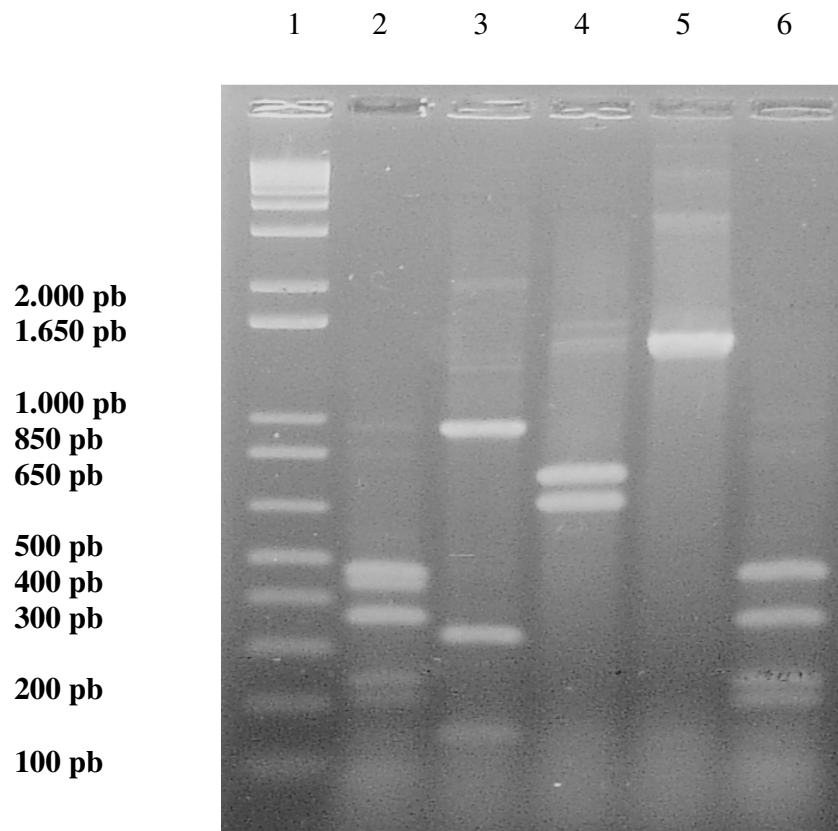


FIGURA 5 – PCR-RFLP do gene *stx₂* mostrando perfil compatível com *stx₂* e *stx_{2vha}*. Linha 1 - marcador de Massa Molecular 1 Kb (Invitrogen). Linha 2 - perfil de *stx₂* digerido com a enzima *HaeIII*. Linha 3 - perfil de *stx_{2vha}* digerido com *HincII*. Linha 4 - perfil de *stx_{2vha}* digerido com *Accl*. Linha 5 - perfil de *stx_{2vha}* digerido com *PvuI*. Linha 6 - perfil de *stx_{2vha}* digerido com *HaeII*.

5.5. Sequenciamento de Cepas de STEC

As seqüências obtidas foram agrupadas utilizando o programa Clustal W, que realiza o alinhamento das mesmas indicando as regiões que são similares e as regiões contíguas reunidas. Para todas as estirpes analisadas dois “contigs” (fragmentos de DNA) foram obtidos, um deles referente à região 5’ do operon e que continha a seqüência de nucleotídeos do promotor e início do gene *stx_{2A}*, e outro que continha o final do gene *stx_{2A}* e o gene *stx_{2B}* completo. Não foi possível completar o sequenciamento dos genes *stx_{2A}* com os iniciadores disponíveis. Por essa razão apenas os fragmentos que continham o gene *stx_{2B}* completo (que segundo a literatura é o que apresenta maior variação) e o final do gene *stx_{2A}* foram utilizados para dar prosseguimento a este estudo. Esses fragmentos (**Query**) foram submetidos ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa BLASTN e as seqüências do banco de dados (**Sbjct**) que apresentaram maior similaridade com os genes presentes nas STEC analisadas estão indicadas no ANEXO I.

As seqüências parciais obtidas sugerem a presença dos seguintes genes do tipo *stx₂* das estirpes analisadas:

STEC 1: gene *stx₂*;

STEC 2: variante de *stx₂* designado pVTEC16;

STEC 6: variante *stx_{2d}* ativável pelo muco intestinal;

STEC 10: variante descrita em STEC sorotipo O48:H21;

STEC 11, variante descrita em STEC sorotipo ONT:H11 e

STEC 12: variante descrita na STEC EBC289.

Importante ressaltar que a seqüência da variante *stx_{2d}* ativável pelo muco intestinal, até então, não tinha sido relatada no Brasil.

5.6. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

A maioria das STEC (96%) foi susceptível a todos os antimicrobianos testados. Três cepas apresentaram resposta intermediária à tetraciclina (TABELA 8 e FIGURA 6).

TABELA 8 – Antibiógrama das STEC isoladas de fezes de bovinos provenientes do Estado do Paraná.

Antibiótico (%)	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Ácido Nalidíxico (NAL)	100	0	0
Ampicilina (AMP)	100	0	0
Cefalotina (CFL)	100	0	0
Ciprofloxacina (CIP)	100	0	0
Cloranfenicol (CLO)	100	0	0
Estreptomicina (EST)	100	0	0
Gentamicina (GEN)	100	0	0
Imipenem (IPM)	100	0	0
Nitrofurantoína (NIT)	100	0	0
Sulfazotrim (SUT)	100	0	0
Tetraciclina (TET)	96	4	0

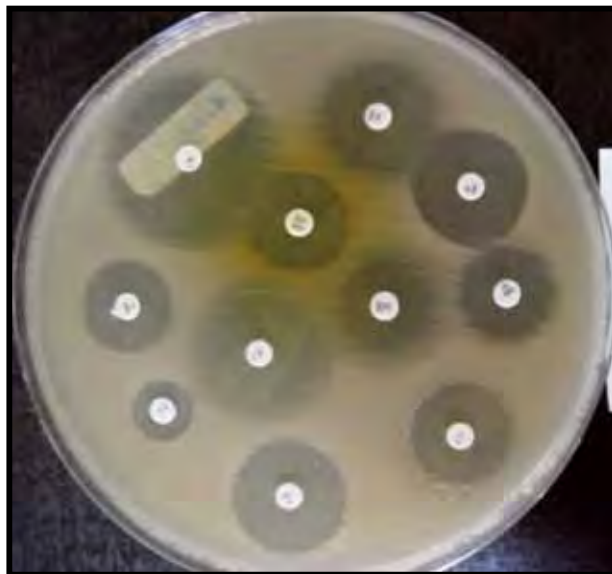


FIGURA 6 – Teste de sensibilidade da amostra CP11 de STEC a antimicrobianos. Observar halos de inibição em torno dos discos.

5.7. Viabilidade de cepas STEC em Queijo Minas Frescal

5.7.1. Determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes no leite pasteurizado.

As análises microbiológicas realizadas no leite pasteurizado utilizado como matéria prima, antes da inoculação de STEC, revelaram ausência de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos indicam que o leite pasteurizado utilizado como matéria prima se enquadrou dentro dos padrões legais, considerando os padrões microbiológicos estabelecidos pelos órgãos oficiais – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001).

5.7.2. Detecção de STEC a partir do queijo elaborado.

A viabilidade, em queijo minas, de cepas de STEC não-O157 contendo diferentes genes de virulência foi analisada. Neste trabalho a viabilidade de STEC não-O157 em queijo minas foi avaliada até o 10º dia, devido ao prazo de validade do produto estabelecido pela legislação ser de 10 dias. Os resultados mostraram que as diferentes cepas de STEC foram detectadas nos queijos após 1, 2, 4, 6 e 10 dias de armazenamento sob refrigeração.

A sobrevivência das estirpes foi confirmada através do cultivo de alíquotas de queijo em água peptonada seguido de subcultivo em ágar MacConkey, meio de onde foram retiradas as colônias para a extração de DNA e a realização de PCR. Foi observado que todas as 16 diferentes cepas permaneceram viáveis no queijo Minas mesmo após 10 dias de conservação a 4°C. Isto confirma que cepas não-O157 são capazes de sobreviver em queijo mantido em condições adequadas de armazenamento.

6. DISCUSSÃO

A importância dos bovinos como fonte direta e indireta de contaminação dos seres humanos com *E. coli* STEC é inquestionável. Embora sua presença possa ser minimizada através da implantação de elevados padrões de higiene, na prática é muito difícil erradicá-las do ambiente devido à colonização assintomática dos animais, da capacidade de sobreviver por longos períodos nas fezes bovinas, no pasto e na água (CAPRIOLI, 2005).

Procedimentos diagnósticos que permitam discriminar estirpes patogênicas de *E. coli* devem ser adotados para evitar riscos à saúde da população e para que sejam adotadas medidas preventivas e terapêuticas (TSCHÄPE e FRUTH, 2001). Neste trabalho foram avaliadas características genotípicas e fenotípicas de STEC em bovinos de corte, avaliando seu risco à saúde pública.

A elevada frequência (37%) de STEC foi semelhante ao encontrado no Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1999), porém mais elevada do que a encontrada no estado de São Paulo (IRINO et al., 2005). Dois estudos conduzidos no sul do Brasil e relataram uma alta frequência de STEC no Rio Grande do Sul (49%) e no Paraná (59%) (MOREIRA et al., 2003; FARAH et al., 2007).

As STEC, neste trabalho, foram classificadas em 34 sorotipos distintos, os mais frequentes foram ONT:H7 (10%), O22:H8, O22:H16 (7%) e ONT:H21 (7%). Os sorotipos ONT:H7 e O22:H8 foram predominantes em outros estudos realizados no Paraná, mas não em outros estados (CERQUEIRA et al., 1999 e FARAH et al., 2007). Estes dados sugerem uma distribuição heterogênea dos sorotipos de STEC nas diferentes regiões do país. Além disso, segundo informações obtidas da “VTEC table” (<http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm>), foram encontrados neste trabalho sorotipos (O10:H42, O17:H41, O41:H2, O98:H41, O113:H12, O117:H8, O124:H11, O159:H21, O175:H21, O179:H8, O181:H4 e ONT:H8) que até então não tinham sido descritos em associação com a STEC. Ressaltando a evolução e a adaptação destes patógenos.

Por outro lado, os sorotipos O22:H8, O113:H21, O174:H21, ONT:H- e OR:H10 encontrados neste trabalho já foram associados a casos graves da síndrome hemolítica urêmica (“VTEC table” - <http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm>). Este dado concorda com um recente estudo feito em água utilizada para consumo humano na Índia onde foram isoladas diversas estirpes de *E. coli* patogênicas, sendo o grupo da STEC o mais frequentemente encontrado. Os sorogrupos de STEC obtidos no referido trabalho também já foram descritos como causadores de enfermidades graves (RAMTEKE & TEWARI, 2007). No Brasil, foram isolados sorogrupos potencialmente patogênicos de STEC em queijo elaborado com leite cru contendo tanto gene *stx*₁ como *stx*₂ (PANETO et al., 2007). Estes dados sugerem que diversos sorogrupos patogênicos não só foram isolados em alimentos como também na água de consumo humano, por isso é necessário criar um sistema de monitoramento, como medida preventiva, tanto para alimentos como para água de consumo da população.

No antibiograma, a grande maioria dos isolados (96%) apresentou sensibilidade aos antimicrobianos testados. Este resultado contrasta com o nível de resistência encontrado em STEC isoladas de bovinos de outras regiões do Brasil e outros países (SCHROEDER et al., 2002; MORA et al., 2005; STELLA, 2006). Provavelmente o baixo nível de resistência pode estar relacionado com o modo de criação extensivo destes animais. A diferença na taxa de resistência encontradas nos diferentes trabalhos e nas diferentes regiões pode representar uma variação na forma de utilização dos antimicrobianos, seja na forma profilática, contínua ou terapêutica. Segundo WEGENER et al. (1999) o princípio para evitar o desenvolvimento de resistência dos animais aos antibióticos envolve controlar os níveis de infecção dos rebanhos e o uso prudente dos antibióticos. Embora os isolados deste estudo tenham apresentado elevada sensibilidade antimicrobiana das *E. coli* STEC, sugere-se uma monitoração contínua do perfil de resistência destes agentes no rebanho bovino.

Os fatores de virulência em *E. coli* STEC foram encontrados em 11 diferentes combinações (FIGURA 2), os mais freqüentes foram *stx*₂ (27%), *stx*₁ *stx*₂ e *stx*₁ *stx*₂ *ehxA* *saa* (16% cada). A elevada freqüência do gene *stx*₂ (89%) sugere um alto potencial de risco à saúde humana, pois o *stx*₂ está relacionado com uma maior

virulência. O gene *eae* foi encontrado em somente uma cepa em associação com *stx*₁ e *ehxA*. A presença do *stx*₂ mais *eae* está associado com casos mais severos da doença nos humanos (BOERLIN et al.,1999; BEUTIN et al.,2004). Embora certos sorotipos de STEC *eae* – negativo também possam causar doença severa, este resultado sugere que a baixa prevalência do genótipo *stx*₂*eae* pode estar relacionada com a ocorrência rara da síndrome hemolítica urêmica no Brasil (GUTH et al., 2002). O gene *saa* foi encontrado em 28 (38%) cepas, sugerindo que outros tipos de adesina podem estar envolvidos no mecanismo de adesão destas cepas. O gene *ehxA* foi encontrado em 32 (44%) cepas, 22 destas cepas foram positivas também para o gene *saa*, indicando uma importante associação entre estes genes de origem plasmidial (BRÜNDER et al.,1999; PATON et al.,2001).

Muitas destas cepas pertencem ao mesmo sorotipo e carregam diferentes genes de virulência, indicando uma diversidade genética e bioquímica dos isolados que podem diferir com relação à habilidade do agente em causar doença. Apenas a sorologia não é suficiente para definir o potencial de causar doença da cepa. Os genes de virulência podem ser identificados servindo de base para análises epidemiológicas para melhor avaliar o risco que a STEC representa aos seres humanos. Portanto a análise molecular é, atualmente, uma ferramenta epidemiológica importantíssima na detecção e caracterização destas estirpes e devem ser amplamente utilizadas em suspeitas de surtos e casos isolados.

Resultados divergentes entre o kit VTEC-RPLA e a PCR multiplex foram observados na TABELA 5. Sessenta e cinco (89%) isolados reagiram positivamente no kit. Três destes isolados identificados como produtores de Stx1 foram positivos para o gene *stx*₁ e *stx*₂ pela técnica de PCR Multiplex. Oito STEC identificadas como negativas para VTEC-RPLA carregavam os genes *stx*₁ mais *stx*₂, *stx*₂ ou *stx*₁. Estas discrepâncias podem ser devido ao baixo nível de expressão dos genes *stx* em algumas cepas ou devido à presença de variantes Stx que não são reconhecidas pelos anticorpos presentes no kit.

Nos últimos anos, devido à disponibilidade das técnicas de biologia molecular, muito conhecimento tem sido obtido sobre os mecanismos de virulência bacteriana e a

patôgenese das infecções. O sequenciamento de genes *stx* revelou a presença de substituições de nucleotídeos nos genes *stx*₁ e *stx*₂ em diversas estirpes, levando à descrição de diversos alelos ou formas variantes desses genes (PATON & PATON, 1998; NAKAO et al., 2002).

Estudos realizados em cultura de células têm mostrado que tais genes diferem em relação à citotoxicidade, e estudos epidemiológicos mostram que enquanto alguns deles são encontrados em estirpes de STEC isoladas de pacientes com diarreia outros são associadas com estirpes que provocam quadros mais graves de doença como colite hemorrágica e SHU (FRIEDRICH et al., 2002). Do ponto de vista de saúde pública, esta identificação é importante para avaliar a severidade do caso, pois algumas variantes são mais perigosas que outras.

Embora tenha sido descrito que o gene *stx*₂ está associado com estirpes mais virulentas, nem todos os seus variantes apresentam o mesmo risco para o desenvolvimento de formas graves de doença, sendo alguns são isolados de casos de diarreia branda. Dessa forma, a subtipagem dos genes *stx*₂ tem sido empregada com a finalidade de se avaliar o potencial de virulência de STEC e o risco para o desenvolvimento de complicações graves.

A diversidade de variantes é maior para Stx2, em número e variabilidade nas características. Essas variantes diferem entre si na seqüência de nucleotídeos, características antigênicas e toxicidade (MAINIL & DAUBE, 2005). A pesquisa das variantes de *stx*₂ foi realizada por PCR-RFLP e foram encontrados oito subtipos: *stx*_{2OX3a/O111}; *stx*₂; *stx*_{2c}; *stx*_{2(vha)}; *stx*_{2(vhb)}; *stx*_{2OX3b}; *stx*_{2vnb/vhc} e *stx*_{2O48}. Dentre este grupo existem subtipos com grande potencial patogênico como o *stx*_{2c}. A presença de *stx*_{2c} e *stx*₂ foi encontrada, principalmente nos casos de colite hemorrágica e SHU (EKLUND et al., 2002). A falta de uniformidade, na literatura, para a classificação de algumas variantes é uma dificuldade nas análises, pois nomenclaturas diferentes têm sido utilizadas para a classificação de algumas variantes.

No presente trabalho seis estirpes de STEC previamente isoladas e detectadas como *stx*₂ foram analisadas por sequenciamento de DNA para verificar a presença de formas variantes. Ambas as fitas de DNA foram seqüenciadas, mas não foi possível

concluir o sequenciamento do gene *stx₂A*. Novos iniciadores devem ser preparados com essa finalidade. Por essa razão e pelo fato de que o gene *stxB* é o que parece apresentar maior variabilidade, optou-se por comparar apenas os fragmentos de 589 nucleotídeos que contém o gene *stx₂B* inteiro e parte do gene *stx₂A* com o banco de dados de seqüências de DNA GenBank. Observou-se alta similaridade, mas não identidade, em 5 dos 6 fragmentos comparados com as seqüências do gene *stx₂* dispostas no GenBank. Isto pode sugerir a presença de variantes que apresentam distribuição regional.

Em quatro estirpes (2, 6, 10 e 12 – ANEXO I) foram detectadas variantes de *stx₂*: variantes encontrados nas estirpes VTEC 16 e EBC 289, descritos recentemente por DE BAETS et al., (2004) cujo potencial de virulência ainda não é conhecido; variante detectado na estirpe O48:H21 descrito por PATON et al (1995), que apresenta atividade citotóxica em células Vero e o variante *stx_{2d}* (GOBIUS et al, 2003). Este último não deve ser confundido com o variante *stx_{2d}* que é isolado de estirpes associadas com diarreia. Pelo contrário, o variante *stx_{2d}* ativável pelo muco apresenta elevado potencial de virulência, tendo a atividade citotóxica ativada no intestino (GOBIUS et al., 2003).

Nossos resultados sugerem que três das seis estirpes de STEC analisadas apresentam alto potencial de virulência e indicam a presença de elevada variabilidade entre os genes *stx₂* de STEC, mas estudos com maior número de estirpes devem ser realizados para confirmar este achado.

Embora a incidência de infecção em humanos por STEC seja, relativamente baixa, a severidade dos sintomas e a freqüência de seqüelas renais, neurológicas e a morte de pessoas são motivos de grande preocupação. Alimentos como o queijo Minas Frescal são amplamente consumidos no Brasil, mas podem tornar-se vias de transmissão de STEC ao ser humano (PANETO et al.,2007). No Brasil, o queijo tipo Minas Frescal é amplamente consumido pela população devido, principalmente, a facilidade do preparo e ao baixo custo. Este queijo possui elevado teor de umidade, por esta razão é altamente perecível. A contaminação de queijos tipo Minas Frescal por coliformes termotolerantes acima dos padrões estabelecidos foi observada em vários trabalhos (PERESI et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2005), mostrando a vulnerabilidade

desse tipo de alimento à proliferação de patógenos. Considerando a elevada frequência de STEC em bovinos de diversas regiões do Brasil e que essas bactérias podem entrar em contato com o leite durante a ordenha, existe a possibilidade de contaminação de queijos com essas bactérias, o que tem sido demonstrado mesmo em países com melhores padrões higiênico-sanitários (RAMSARAN et al., 1998; VERNOSY-ROZAND et al., 2005).

Neste trabalho a viabilidade de STEC não O-157 em queijo minas foi avaliada até o 10º dia, devido ao prazo de validade do produto estabelecido pela legislação ser de 10 dias. Os resultados mostraram que as diferentes cepas de STEC foram detectadas nos queijos após 1, 2, 4, 6 e 10 dias de armazenamento sob refrigeração. A viabilidade das estirpes foi confirmada através do cultivo de alíquotas de queijo em água peptonada seguido de subcultivo em ágar MacConkey, meio de onde foram retiradas as colônias para a extração de DNA e a realização de PCR. Foi observado que todas as diferentes cepas permaneceram viáveis no queijo Minas mesmo após 10 dias de conservação a 4°C. Isto confirma que estirpes não-O157 são capazes de sobreviver em queijo mantido em condições adequadas de armazenamento e que, portanto, podem ser veiculadas aos seres humanos dessa forma.

Muitos casos de infecção por STEC foram atribuídos ao consumo de produtos lácteos contaminados (NATARO & KAPER, 1998). Surto e casos esporádicos de infecções causadas após o consumo de queijo contaminado com STEC foram relatados em diversos países (CDC, 2000; CURNOW, 1994). Até o momento não existem relatos de surtos causados por STEC no Brasil. Porém a frequência elevada dessas bactérias em bovinos (PIGATTO, 2004; FARAH et al., 2007) indica alto potencial para a contaminação da carne e leite. Além disso, em estudo envolvendo águas de descarte de abatedouros e águas de rios, foram encontrados alta frequência de STEC sugerindo uma significativa distribuição deste agente no ambiente e, portanto, um importante problema de saúde pública (LOUKIADIS et al., 2006).

A doença é de suma importância, do ponto de vista epidemiológico, sendo necessária a adoção de métodos de prevenção. Portanto, este trabalho mostra a presença de STEC associadas com doenças humanas em bovinos, indicando que estes

animais podem representar uma fonte de infecção humana e que o manejo apropriado dos animais ajuda na prevenção de infecções.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados sugerem a presença de elevada variabilidade genética dos isolados estudados.
- Foram encontrados 34 sorotipos de STEC. Destes 11 não tinham sido, até então associados com STEC e cinco foram associados a casos graves da infecção.
- O perfil de virulência mais prevalente foi *stx₂* (27%) que é o mais patogênico.
- Os subtipos mais freqüentes foram *stx₂* e a variante *stx_{2c}*, ambos com elevado potencial de patogenicidade.
- A presença da variante *stx_{2d}* ativável pelo muco intestinal foi relatada pela primeira vez no Brasil e sugere alto potencial de virulência nas estirpes que as contém.
- Existe uma elevada susceptibilidade dos isolados de STEC aos antimicrobianos testados.
- As STEC avaliadas foram capazes de sobreviver em queijo mantido em condições adequadas de armazenamento por até 10 dias.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As graves consequências que uma infecção por STEC pode desencadear no ser humano são bem conhecidas. Este trabalho ressalta a presença de isolados de STEC, associados à doença no ser humano, em fezes de bovinos no estado do Paraná.

Como os bovinos representam importante reservatório, a adoção de um sistema de monitoramento e de prevenção prático e eficiente é fundamental para evitar episódios de infecção na população. E, quais seriam as alternativas de prevenção e monitoramento mais viáveis neste caso?

Para atingirmos metas de prevenção é necessário integrar toda a cadeia produtiva. O trabalho deve iniciar com um adequado manejo dos animais, evitando indivíduos positivos no rebanho, desinfetando instalações, fornecendo água de boa qualidade, armazenando os alimentos dos animais em locais apropriados e o adequado destino dos dejetos. Estas medidas, além de beneficiar a produção, também evita a contaminação do ambiente.

Além de um bom manejo, outro fator importante é a educação em saúde e a transmissão de conhecimento para trabalhadores rurais e manipuladores de alimentos. Aos trabalhadores rurais fornecer noções de higiene pessoal, manutenção de roupas limpas, lavagem das mãos, como manejar o rebanho satisfatoriamente, armazenar os alimentos, eliminar dejetos e outros. Aos manipuladores de alimentos noções de higiene pessoal, além de, como manipular adequadamente a matéria prima, como processar e armazenar este alimento até chegar às mãos do consumidor. A educação e informação facilitam a adoção das boas práticas de fabricação para obtenção de um alimento seguro.

Outro aspecto fundamental é a notificação de casos suspeitos às autoridades sanitárias. O episódio deve ser notificado para que investigações epidemiológicas sejam desencadeadas estabelecendo prováveis causas e associações com alimentos. Neste mesmo contexto, a atuação da inspeção por parte do Ministério da Agricultura, é fundamental para obtermos alimentos de boa qualidade. Alimentos produzidos clandestinamente comprometem medidas de controle do agente.

Portanto, levar informação aos trabalhadores, trabalhar adequadamente com os animais, boas práticas na indústria de alimentos e uma inspeção efetiva por parte das autoridades sanitárias propiciarão a criação e manutenção de programas de prevenção efetivos, diminuindo o risco do agente à população.

9. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis e enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Bacterioses y micosis. **Publicacion Científica y Técnica**, Washington, v. 1, n. 580, p. 398, 2001.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Washington, v. 25, n. 1, p. 3389-3402, 1997.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

BASTIAN, S.; CARLE, I.; GRIMONT, F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Research In Microbiology**, Paris, v. 149, n. 1, p. 457-472, 1998.

BESSER, T. E.; HANCOCK, D. D.; PRITCHETT, L. C.; Mc RAE, E. M.; RICE, D. H.; TARR, P. I. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 726-729, 1997.

BETTELHEIM, K. A.; BEUTIN, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **Journal of Applied Microbiology**, Whashington, v. 95, n. 1, p. 205-217, 2003.

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. **Journal of clinical Microbiology**, Washington, v. 1, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 3, p. 631-635, 1995.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAULFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 1099-1108, 2004.

BOERLIN, P.; McEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in human. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999.

BRASIL. Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997 Aprova regulamento técnico para princípios gerais de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, 22 set. 1997.

BRESS, I. M. P.; MORGAN, T. W.; ACKERMANN, M. R.; NYSTROM, E. D.; SAMUEL, J. E.; CORNICK, N. A.; MOON, H. W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **PNAS**, Washington, v. 97, n. 19, p. 10325-10329, 2000.

BRIAN, M. J.; FROSLONO, M.; MURRAY, B. E.; MIRANDA, A.; LOPEZ, E. L.; GOMEZ, H. F.; CLEARLY, T. G. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic

Escherichia coli infection and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1, p.1801-1806, 1992.

BROTAM, 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.; BUCHANAM, 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.

BRÜNDER, 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.

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; AÇAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M.; MÄRTLBAUER, E. M. Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of Bovine Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 2106-2112, 2003.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. 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. 38-47

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, Washington, v. 36, n. 3, p. 289-311, 2005.

CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds – Centers for Disease Control and Prevention. **Morbidity and Mortality**, Winconsin, v. 49, n. 1, p. 911 – 913, 2000.

CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 111-121, 1999.

CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A.; ZADIK, P. M.; JEWES, L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 35, n. 1, p. 107-110, 1991.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; HIGGINS, R. Untreated milk as source of verotoxigenic *E. coli* O157. **Veterinary Record**, London, v. 133, n. 1, p. 171-172, 1993.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence –Associated Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

CRAY JR, W. C.; MOON, H. C.; Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 1586-1590, 1995.

CUBBON, M. D.; COIA, J. E.; HANSON. M. F. A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in human faeces. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 44, n. 1, p. 219-222, 1996.

CURNOW, J. *E. coli* O157:H7 phage type 28 infections in Grampian. **Communication Diseases Environmental Health Scotland**, v. 28, n. 1, p. 1, 1994.

DARGATZ, D. A.; WELLS, S. J.; THOMAS, L. A.; HANCOCK, D. D.; GARBER, L. P. Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in feces of feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 5, p. 466-470, 1997.

DE BAETS, L.; TAELEN, I. V.; FILETTE, M.; PIÉRARD, D.; ALLISON, L.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J. P.; IMBERECHTS, H. Genetic Typing of shiga Toxin 2 Variants of *Escherichia coli* by PCR_Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 6309-6314, 2004.

DE BOER, E.; HEUVELINK, A. E. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Symposium Series Society for Applied Microbiology**, Washington, v. 29, p. 133-143, 2002.

DUFFY, G.; GARVEY, P.; WASTESON, Y.; COIA, J. E.; MC DOWELL, D. A. (Ed.). Epidemiology of verotoxigenic *E. coli*. Dublin: The National Food Center, 2001. Disponível em: <<http://www.research.teagasc.ie/vteceurope/epitechbook.htm>> Acesso em: 01 ago. 2007.

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying genes: *stx* and *stx*-positive virulence profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 4585-4593, 2002.

EWING, W. H. **Edwards & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th. Ed, New York: Elsevier Science, 1986.

FAGAN, P. K.; HORNITZKY, K. M. A.; BETTELHEIM, K. A.; DJORDJEVIC, S. P. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1* e *stx2*), Intimin (*eaeA*), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *ehxA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 868-872, 1999.

FAITH, N. G.; SHERE, J. A.; BROSCHE, R.; ARNOLD, K. W.; ANSAY, S. E.; LEE, M. S.; LUCHANSKY, J. B.; KASPAR, C. W. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1, p. 1519-1225, 1996.

FARAH, S. M. S. S.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 607-612, 2007.

Food and Drug Administration. **Manual de Enfermidades Transmitidas por Alimentos**. Jaboticabal: Funep, 1999, p. 27-29.

FERNANDEZ, T. A., MÁRSICO, T. E., LEAL, P. C., SILVA, L. R. J., BARRETO, S. L., SILVA, A. C. O. Avaliação microbiológica e sensorial de marcas de queijo minas tipo frescal clandestino e submetido ao regime de serviço de inspeção federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 3., 2005, Búzios, Rio de Janeiro, **Anais-** CD-ROM, 2005.

FEY, P. D.; WICKERT, R. S.; RUPP, M. E.; SAFRANEK, T. I.; HINRICHS, S. H. Prevalence of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. **Emerging and Infectious Diseases**, Washington, v. 6, n. 1, p. 530-533, 2000.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11 ed. St. Louis: Mosby, 2002.

FRIEDRICH, A. W.; BIELASZEWSKA, M.; KARSCH, H. Diagnosis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Journal of Laboratory Medicine**, Washington, v. 26, n. 1, p. 183-190, 2002.

FUKUSHIMA, H.; GOMYODA, M. An Effective, Rapid and Simple Method for Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from Faeces and Food Samples. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Berlin, v. 289, n. 1, p. 415-428, 1999.

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

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

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

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. **Epidemiological Review**, Oxford, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUAN, S.; XU, R.; CHEN, S.; ODUMERU, J.; GYLES, C. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animals and human sources.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 68, n. 6, p. 2690-2698, 2002.

GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1085-1089, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; RICE, D. H. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle and Impact of Management Practices. 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. 85-91.

HART, C. A.; TREES, A. J.; DUERDEN, I. Zoonoses. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 46, p. 4-33, 1997.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. **Journal of Dairy Science**, Washington, v. 88, p. 450-465, 2005.

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

JEANNMOUGIN, F.; THOMPSON, J. D.; GOUY, M.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends in Biochemical Science**, Washington, v. 23, p. 403-405, 1998.

JENKINS, C.; PERRY, N. T.; CHEASTY, T.; SHAW, D. J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G. J.; SMITH, H. R.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Distribution of the *saa* Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1775-1778, 2003.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; BEZANSON, G. S. Citotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colits in Canada. **Lancet i**, v. 76 (letter), 1983.

JOHNSON, J. L.; BROOKE, C. L.; FRITSCHER, S. L. Comparison of the BAX for screening *E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4390-4395, 1998.

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

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

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

KENSCH, G. T.; ACHECON, D. W. K. Patógenos bacterianos entéricos invasivos e causadores de dano tecidual: diarréia sanguinolenta e disenteria. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia de Doenças Infecciosas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.161-171.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

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

KUDVA, I. T.; HATFIELD, P. G.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 431-433, 1996.

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

LIN, W.; KURAZONO, H.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y. Detection of Various Variant Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by Polymerase Chain Reaction. **Microbiology and Immunology**, Washington, v. 37, p. 543-548, 1993.

LIU, Y.; LI, Y.; Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 1673, p. 1-9, 2002.

LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; DE ROSA, M. F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in South América. 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. 30-37.

LOUKIADIS, E.; KE'ROURE'DAN, M.; BEUTIN, L.; OSWALD, E.; BRUGE'RE, H. Characterization of Shiga Toxin Gene (*stx*)-Positive and Intimin Gene (*eae*)-Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3245-3251, 2006.

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

MANNING, S. D.; MADERA, R. T.; SCHENEIDER, W.; DIETRICH, S. E.; KHALIFE, W.; BROWN, W.; WHITTAM, T. S.; SOMSEL, P.; RUDRIK, J. T. Surveillance for Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Michigan, 2001-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, 2007, disponível em <<http://www.cdc.gov/EID/content/13/2/318.htm>> Acesso em: 3 de novembro de 2007.

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

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

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.

MENG, J. ZHAO, S.; DOYLE, M. P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **Internal Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 229-235, 1998.

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.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; NAKAYAMA, T.; EJIMA, Y.; HIROE, K.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; USAMI, S.; YONEKAWA, M.; SADAMOTO, K.; TAKAYA, S.; SAKAI, N. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. 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, 1998. p. 73-81.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A ciência do DNA**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

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. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 93, p. 179-183, 2003.

NAKAO, H.; KIMURA, K.; MURAKAMI, H.; MARUYAMA, T.; TAKEDA, T. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Japan. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 289-297, 2002.

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

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

O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W.; FORMAL, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with hemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**, London, v. 2, p. 702, 1983.

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Washington, v. 146, p. 763-769, 1982.

OLSVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.;

WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology principles and applications**, p. 271-276. Londres: ASM Press, 1993.

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

PARK, S.; WAROBO, R. W.; DURST, R. A. ***Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen**: a literature review. Critical reviews in food science and nutrition, 1999.

PATON, A.; PATON, J. C.; GOLDWATER, P. N.; HEUZENROEDERB, M. W.; MANNING, P. A. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-1 operon of *Escherichia coli* O111:H⁻. **Gene**, Nova York, v. 129, p. 87-92, 1993.

PATON, A.; BOURNE, A. J.; MANNING, P. A.; PATON, J. C. Comparative Toxicity and Virulence of *Escherichia coli* Clones Expressing Variant and Chimeric Shiga-Like Toxin Type II Operons. **Infectious and Immunology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2450-2458, 1995.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 598-602, 1998b.

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.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 271-274, 2002.

PANETO, B. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.

PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of New Verotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 11, p. 3317-3322, 1998.

PIGATTO, C. P. 2004 **Isolamento e frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no estado do Paraná**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PRUIMBOOM-BREES, I. M.; MORGAN, T. W.; ACKERMANN, M. R.; NYSTROM, E. D.; SAMUEL, J. E.; CORNICK, N. A.; MOON, H. W. Cattle lack vascular receptors for

Escherichia coli O157:H7 Shiga toxins. **Proceedings National Academy Science**, Washington, v. 97, n. 19, p. 10325-10329, 2002.

RAMSARAN, H.; CHEN, J.; BRUNKE, B.; HILL, A.; GRIFFITHS, M. W. Survival of Bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Soft Cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 7, p. 1810-1817, 1998.

RAMTEKE, P. W.; TEWARI, H. L. Serogroups of *Escherichia coli* from Drinking Water. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 130, p. 215-220, 2007.

REIMANN, H. P. R.; CLIVER, D. O. *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v. 14, n. 1, 1998.

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 Urêmico-Hemolítica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, 1999.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colits associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

SAFARIKOVA, M.; SAFARIK, I. Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 e O157 from vegetables. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 36-39, 2001.

SANGER, F.; NICKLED, S.; COULSON, A. R. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy Science, USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P. I.; FROSCHE, 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.

SCHROEDER, C. M.; MENG, J.; ZHAO, S.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, C.; Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. **Emerging and Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 1409-1414, 2002.

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

SMITH, D. G. E.; NAYLOR, S. W.; GALLY, D. L. Consequence of EHEC in humans and cattle. **Internal Journal of Medical Microbiology**, Wurzburg, n. 292, p. 169-183, 2002.

SPIKA, J. S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P.; MILLEY, D.; WILSON, J.; WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canada. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 23-29.

STELLA, A. E. 2006. **Aspectos Epidemiológicos e Suscetibilidade a Antimicrobianos de *Escherichia coli* O157:H7 e outros sorogrupos isolados de fezes de bovinos leiteiros, água e leite na região de Ribeirão Preto-SP**. 2006. 56 f. Dissertação

(Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

TARR, P. I. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.20, p. 1-9, 1995.

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

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

TSCHÄPE, H.; FRUTH, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: MÜLDORFER, I.; SCHÄFER, K. P. Emerging Bacterial Pathogens. v. 8. In: SCHMIDT, A. (Ed.) **Contributions to Microbiology**. Basel: Karger, 2001, p. 1.11.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3 ed. Washington: American Public Health Association, Edwards Brothers, 1992, 1219 p.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 903-905, 2004.

VERNOZY-ROZAND, C; MONTET, M. P.; BERARDIN, M.; BAVAI, C.; BEUTIN, L. Isolation and Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Strains From Raw Milk Cheeses in France. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 235-241, 2005.

VIEGAS, C. V. **Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em carne bovina crua comercializada em Porto Alegre**. 1996. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

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

WAHLSTRÖM, H. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157. In: HOPP, P.; WAHLSTRÖM, H.; HIRN, J.: **Zoonoses in Sweden up to and including 1999**. Uppsala: Reklan & Katalogtryck, 2001, p.19-22.

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

WEGENER, H. C.; AARESTRUP, F. M.; GERNER-SMITD, P.; BAGER, F. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanlose, n. 95, p. 51-57, 1999.

WHO, World Health Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO **Scientific Working Group Meeting**. Geneva, Switzerland, 1998

WILLSHAW, G. A.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; THOMAS, A.; ROWE, B. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxin-producing strain of *E. coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 897-902, 1994.

ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Use of Tellurite for the Selection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 39, p. 155-158, 1993.

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; LIESEGANG, A.; TSCHAPE, H.; SCHMIDT, H.; BITZAN, M.; KARCH, H. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2134-2140, 2000.

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, Characterization and Distribution of Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1441-1446, 2002.

ANEXO I

1. Alinhamento e comparação da sequência de nucleotídeos da cepa STEC 1 com a região *stx* correspondente do Banco de Genes.

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
	Escherichia coli O157:H- strain					
<u>AF525041.1</u>	550/98 Shiga toxin 2 subunit A (stxA2) and Shiga toxin 2 subunit B (stxB2) genes, complete cds	<u>1058</u>	1058	100%	0.0	99%

gb|AF525041.1| Escherichia coli O157:H- strain 550/98 Shiga toxin 2 subunit A (stxA2) and Shiga toxin 2 subunit B (stxB2) genes.

Tamanho (length) = 1422

Escore = 1058 bits (1172)

Identidade = 588/589 (99%), Gaps = 0/589 (0%)

Strand = Plus/Plus

Query	1	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG	60
Sbjct	678	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG	737
Query	61	ATGGTGTCTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG	120
Sbjct	738	ATGGTGTCTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG	797
Query	121	CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGA	180
Sbjct	798	CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGA	857
Query	181	GTCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAACAATACATTAT	240
Sbjct	858	GTCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAACAATACATTAT	917
Query	241	GGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGG	300
Sbjct	918	GGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGG	977
Query	301	GTAAATTAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC	360
Sbjct	978	GTAAATAAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC	1037

```

Query 361 TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGTATAATGA 420
|||||
Sbjct 1038 TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGTATAATGA 1097

Query 421 GGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT 480
|||||
Sbjct 1098 GGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT 1157

Query 481 GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTAC 540
|||||
Sbjct 1158 GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTAC 1217

Query 541 CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGA 589
|||||
Sbjct 1218 CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGA 1266

```

2. Alinhamento e comparação da sequência de nucleotídeos da cepa STEC 2 com a região *stx* correspondente do Banco de Genes.

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
	Escherichia coli clone pVTEC16					
<u>AY443053.1</u>	verocytotoxin 2 variant A subunit and verocytotoxin 2 variant B subunit genes, complete cds	<u>1056</u>	1056	100%	0.0	99%

Escore = 1056 bits (1170)

Identidade = 587/589 (99%), Gaps = 0/589 (0%)

Strand = Plus/Plus

```

Query 1 TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG 60
|||||
Sbjct 775 TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG 834

Query 61 ATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG 120
|||||
Sbjct 835 ATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG 894

Query 121 CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGCTCTGTTTCGCGCCGTGAATGAAGAGA 180
|||||
Sbjct 895 CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGCTCTGTTTCGCGCCGTGAATGAAGAGA 954

Query 181 GTCAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAACAATACATTAT 240
|||||
Sbjct 955 GTCAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAACAATACATTAT 1014

```


Tamanho (length) = 1461

Escore = 1036 bits (1148)

Identidade = 583/589 (98%), Gaps = 0/589 (0%)

Strand = Plus/Plus

```

Query    1      TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG  60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   828      TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG  887

Query    61      ATGGTGTCTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCGGCGATACTGGGCACTGTGG  120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   888      ATGGTGTCTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG  947

Query   121      CCGTTTACTGAATTGTTCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTTCGCGCCGTGAATGAAGAGA  180
          |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   948      CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTTCGCGCCGTGAATGAAGAGA 1007

Query   181      GTCAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAAACAATACATTAT  240
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1008      GTCAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAATAAACAATACATTAT  067

Query   241      GGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGG  300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1068      GGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGG 1127

Query   301      GTAAATAAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC  360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1128      GTAAATAAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC 1187

Query   361      TGTCAATGCAATGGCGGCGGATTGCGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTTCCAAGTATAATGA  420
          ||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1188      TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTTCCAAGTATAATGA 1247

Query   421      GGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT  480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1248      GGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT 1307

Query   481      GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGCTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTAC  540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1308      GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGCTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTAC 1367

Query   541      CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGAATGA  589
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1368      CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGA  1416

```

5. Alinhamento e comparação da sequência de nucleotídeos da cepa STEC 11 com a região *stx* correspondente do Banco de Genes.

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
<u>EF079674.1</u>	Escherichia coli O157:H7 strain GZ-021210 Shiga toxin 2 subunit A and Shiga toxin 2 subunit B genes, complete cds	<u>1032</u>	1032	100%	0.0	98%
<u>AB168110.1</u>	Escherichia coli O157:H7 q, stx2A, stx2B genes for antiterminator Q protein, Shiga toxin 2 A subunit, Shiga toxin 2 B subunit, complete cds, strain:Thai-12	<u>1032</u>	1032	100%	0.0	98%
<u>AF500191.1</u>	Escherichia coli isolate EC1871a serotype ONT:H11 variant Shiga toxin type 2 A subunit (stx2dA) and variant Shiga toxin type 2 B subunit (stx2dB) genes, complete cds	<u>1032</u>	1032	100%	0.0	98%
<u>AF500189.1</u>	Escherichia coli isolate EC1720a serotype O174:H21 variant Shiga toxin type 2 A subunit (stx2dA) and variant Shiga toxin type 2 B subunit (stx2dB) genes, complete cds	<u>1032</u>	1032	100%	0.0	98%

gb|EF079674.1| Escherichia coli O157:H7 strain GZ-021210 Shiga toxin 2 subunit A and Shiga toxin 2 subunit B genes, complete cds

Tamanho (length) = 1241

Escore = 1032 bits (1144)

Identidade = 581/589 (98%), Gaps = 0/589 (0%)

Strand = Plus/Plus

Query	1	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG	60
Sbjct	653	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG	712
Query	61	ATGGTGTCTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCGGCGATACTGGGCACTGTGG	120
Sbjct	713	ATGGTGTCTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCGGCGATACTGGGCACTGTGG	772
Query	121	CCGTTTACTGAATTGTCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGATA	180
Sbjct	773	CCGTTTACTGAATTGTCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGATA	832
Query	181	GTCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAAATAACAATACATTAT	240
Sbjct	833	GTCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCGTTATAAAAAATAACAATACATTAT	892
Query	241	GGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTCTTTATATACAACGG	300
Sbjct	893	GGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGG	952
Query	301	GTGAATAAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC	360
Sbjct	953	GTAAATAAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC	1012
Query	361	TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGCGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGTATAATGA	420
Sbjct	1013	TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGCGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGTATAATGA	1072
Query	421	GAATGATACATTCACAGTAAAAGTGGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT	480
Sbjct	1073	GAATGATACATTCACAGTAAAAGTGGCCGGAAGAGTACTGGACCAGTCGCTGGAATCT	1132
Query	481	GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTNACAGGAATGACNGTCACAATCAAATCCAGTAC	540
Sbjct	1133	GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTAC	1192
Query	541	CTGTGNATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGA	589
Sbjct	1193	CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGA	1241

6. Alinhamento e comparação da sequência de nucleotídeos da cepa STEC 12 com a região *stx* correspondente do Banco de Genes.

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
	Escherichia coli isolate EBC289					
<u>AY443049.1</u>	verocytotoxin 2 variant A subunit and verocytotoxin 2 variant B subunit genes, complete cds	<u>1027</u>	1027	100%	0.0	98%

gb|AY443049.1 Escherichia coli isolate EBC289 verocytotoxin 2 variant A subunit and verocytotoxin 2 variant B subunit genes.

Tamanho (length) = 1241

Escore = 1027 bits (1138)

Identidade = 581/589 (98%), Gaps = 0/589 (0%)

Strand = Plus/Plus

Query	1	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG	60
Sbjct	653	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGG	712
Query	61	ATGGTGTCTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG	120
Sbjct	713	ATGGTGTCTCAGAGTGGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGTACTGTGG	772
Query	121	CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGATA	180
Sbjct	773	CCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGATA	832
Query	181	GTCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCTCGTTATAAAAAATAACAATACATTAT	240
Sbjct	833	GTCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCCCTTATAAAAAATAACAATACATTAT	892
Query	241	GGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACCACGG	300
Sbjct	893	GGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGG	952
Query	301	GTAAATAAAGGAGTTTAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC	360
Sbjct	953	GTAAATAAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTC	1012
Query	361	TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGCGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGTATAATGA	420
Sbjct	1013	TGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGCGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGTATAATGA	1072

```

Query  421  GAATGATACATTCACAGTAAAAGTGTCGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT  480
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  GAATGATACATTCACAGTAAAAGTGGCCGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCT  1132

Query  481  GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATTGCTGTCACGATCAAATCCAGTAC  540
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1133  GCAACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTAC  1192

Query  541  CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGAATGA  589
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  CTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGA  1241

```