

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

CECÍLIA MATHEUS GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
***ESCHERICHIA COLI rfb_{O113}*-POSITIVAS ISOLADAS DE BOVINOS SADIOS EM**
MIRACEMA, RJ.

NITERÓI

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CECÍLIA MATHEUS GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
ESCHERICHIA COLI rfb₀₁₁₃-POSITIVAS ISOLADAS DE BOVINOS SADIOS EM
MIRACEMA, RJ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense como requisito para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. ALOYSIO DE MELLO FIGUEIREDO CERQUEIRA
Co-orientador: Prof. Dr. JOÃO RAMOS COSTA ANDRADE

Niterói
2009

CECÍLIA MATHEUS GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
ESCHERICHIA COLI rfb₀₁₁₃-POSITIVAS ISOLADAS DE BOVINOS SADIOS EM
MIRACEMA, RJ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense como requisito para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Aprovado em abril de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Lilenbaum
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dr^a. Beatriz Ernestina C. Guth
Universidade Federal de São Paulo

Dr^a. Kinue Irino
Instituto Adolfo Lutz

Niterói

2009

Dedico este estudo a todas as pessoas que sempre me apoiaram e acreditaram no meu sucesso, em especial, a minha família que é a base de todo o meu crescimento.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus, em primeiro lugar; o responsável por cada grande oportunidade que surgiu na minha vida ao longo desses anos de trabalho.

Agradeço, também, a toda minha família que me apoiou em cada decisão e, em especial, a minha mãe, Márcia Matheus Guimarães, que a cada instante me incentivou e acreditou na minha vitória, mesmo nos momentos mais difíceis.

Depois de tantos anos, tenho muito a agradecer ao Prof. Dr. Aloysio M. F. Cerqueira, que admiro, como pesquisador, pela fibra, seriedade e competência, e, como pessoa, pela bondade, humanidade e amizade.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. João R.C. Andrade e a sua equipe do Laboratório no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em especial a Thais Zangali e Gabriela Alves, por toda ajuda e colaboração de fundamental importância neste estudo.

Um agradecimento, também especial, a equipe do Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – Carlos G. Malbrán (ANLIS – Buenos Aires, Argentina) por todo auxílio, maravilhosa hospitalidade e colaboração na realização deste estudo, principalmente à Dra. Marta Rivas e Carolina Carbonari.

Agradeço aos meus amigos e colaboradores do Laboratório de Enteropatógenos e Microbiologia de Alimentos na Universidade Federal Fluminense que sempre estiveram presente, ajudando e participando ativamente de diversas etapas ao longo desses anos. Em especial, agradeço a Matheus F. L. de Barros, Denise N. Nunes, Davi S. C. C. H. A. da Costa, Raquel de S. Sant'Anna, Lavicie Araes e Renata F. Ferreira.

Agradeço aos funcionários técnico-administrativos do Instituto Biomédico – UFF pelo carinho e por toda prestatividade. Em especial a Maria Laura Dantas.

À Faperj pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBEJTIVOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Epidemiologia de STEC	20
3.2 Persistência de STEC no animal e no ambiente	24
3.3 Virulência e patogenia de STEC/EHEC	26
3.4 STEC do sorotipo O113:H21	31
3.5 Diagnóstico e subtipagem molecular de STEC	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Amostras bacterianas e condições gerais de isolamento	37
4.2 Coleta de amostras	40
4.3 Processamento das amostras coletadas em 2008	40
4.4 Isolamento de colônias <i>rfb</i>_{O113}-positivas	41
4.5 Pesquisa de Fatores de Virulência a partir de Ensaio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	42
4.5.1 Obtenção do DNA molde de isolamentos <i>rfb</i>_{O113}-positivos	42
4.5.2 Ensaio de PCR	42
4.5.3. Eletroforese em gel de agarose	43
4.6 Sorotipagem	44
4.7 Teste de fermentação do sorbitol	44
4.8 Produção de enterohemolisina	45

	Página
4.9	Ensaio de Citotoxicidade 46
4.10	Extração plasmidial 46
4.11	Análise da estrutura clonal dos isolados 48
4.11.1	Amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) 48
4.11.1.1	Obtenção de DNA 48
4.11.1.2	Reação de Amplificação 49
4.11.1.3	Eletroforese em gel de agarose 50
4.11.1.4	Interpretação e análise de perfis de RAPD 50
4.11.2	Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) 51
4.11.2.1	Montagem dos “plugs” de agarose 51
4.11.2.2	Processo de lise <i>in situ</i> 52
4.11.2.3	Digestão enzimática do DNA nos “plugs” 53
4.11.2.4	Montagem do gel de corrida 54
4.11.2.5	Condições de corrida 54
4.11.2.6	Interpretação e análise dos perfis de PFGE 55
5	Resultados 59
5.1	Isolamento de colônias <i>rfb</i>₀₁₁₃-positivas 59
5.2	Caracterização genotípica 60
5.3	Testes fenotípicos 69
5.3.1	Sorotipagem das amostras <i>rfb</i>₀₁₁₃-positivas isoladas 69
5.3.2	Fermentação de sorbitol 69
5.3.3	Produção de enterohemolisina 70
5.3.4	Ensaio de citotoxicidade 70
5.4	Presença de plasmídios de alto e baixo peso molecular 70
5.5	Análise da estrutura clonal dos isolados 75
5.5.1	Perfil genético dos isolados gerados por ensaios de RAPD 75

		Página
5.5.2	Perfil genético dos isolados gerados por ensaios de PFGE	81
5.6	Determinação de amostras distintas após caracterização fenotípica e genotípica	85
6	Discussão	87
7	Conclusões	99
8	Referências bibliográficas	100

Lista de Ilustrações:

		Página
Tabela 01	Isolamentos de <i>E. coli rfb 0113</i> provenientes de amostras fecais de bovinos sadios de Miracema, RJ caracterizados no presente estudo.	39
Tabela 02	Iniciadores e condições adotadas nas reações de PCR utilizadas neste estudo.	56 a 58
Tabela 03	Perfis genéticos de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	62
Tabela 04	Perfis genéticos de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	63
Figura 01	Distribuição de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ, dentre os oito perfis genéticos observados.	64
Figura 02	Ocorrência simultânea de genes de virulência em amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas material fecal de bovinos pertencentes a oito perfis genéticos distintos.	65
Figura 03	Distribuição dos perfis de virulência detectados entre as amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ, em cada rebanho.	66
Figura 04	Frequência de perfis genéticos, observados em amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios, com ocorrência simultânea de múltiplos genes de virulência.	67
Figura 05	Foto representativa de gel de agarose a 1% de amplificações positivas para alguns genes.	68
Tabela 05	Caracterização fenotípica de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	72
Tabela 06	Ocorrência de plasmídios de alto e baixo peso molecular em amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	73
Figura 06	Foto representativa de gel de agarose a 0,8% da extração plasmidial de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	74
Figura 07	Foto representativa de gel de agarose a 0,8% da extração plasmidial de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	74

Figura 08	Foto representativa de gel de agarose com amostras submetidas a ensaios de RAPD com o iniciador 1252.	77
		Página
Figura 09	Foto representativa de gel de agarose com amostras submetidas a ensaios de RAPD com o iniciador 1254.	77
Figura 10	Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após amplificação randômica (RAPD) com os iniciadores 1252 e 1254 de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	78
Figura 11	Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após amplificação randômica (RAPD) com os iniciadores 1252 e 1254 de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios do rebanho 01 em Miracema, RJ.	79
Figura 12	Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após amplificação randômica (RAPD) com os iniciadores 1252 e 1254 de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios do rebanho 03 em Miracema, RJ.	80
Figura 13	Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após digestão do DNA, por enzimas de restrição (<i>Xba</i> I e <i>Bln</i> I), de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.	82
Figura 14	Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após digestão do DNA, por enzimas de restrição (<i>Xba</i> I e <i>Bln</i> I), de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ, no rebanho 01.	83
Figura 15	Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após digestão do DNA, por enzimas de restrição (<i>Xba</i> I e <i>Bln</i> I), de amostras de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ, no rebanho 03.	84
Tabela 07	Perfis genotípicos e fenotípicos de amostras distintas de <i>E. coli rfb</i> ₀₁₁₃ caracterizadas no presente estudo.	86

Lista de Abreviaturas e Unidades:

α hly: alfa-hemolisina de *Escherichia coli*
 A/E: lesão "attaching and effacing"
astA: gene codificador de EAST-1
Bln I: enzima de restrição
 Caco-2: células de adenocarcinoma de cólon humano
 CDT: toxina de efeito citotóxico
cdt-V: gene codificador de toxina de efeito citoletal distensora
 CHO-K1: células epiteliais de ovário de hamster chinês
 CLED: "Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient"
 cm: centímetro
 DAEC: *E. coli* que apresenta aderência difusa
 DNA: ácido desoxirribonucléico
 dNTP: desoxinucleotideo trifosfato
 DO: densidade óptica
eae: gene codificador da intimina
 EAEC: *E. coli* enteroagregativa
 EAST-1: enterotoxina termoestável de EAEC
efa1: gene codificador de adesina Efa1
 EHEC: *E. coli* enterohemorrágica
 Ehly: enterohemolisina de STEC
ehxA: gene codificador da enterohemolisina
 EIEC: *E. coli* enteroinvasora
 EPEC: *E. coli* enteropatogênica
escC: gene codificador de estrutura do sistema de secreção do tipo III
escJ: gene codificador de estrutura do sistema de secreção do tipo III
 Esp: Serina protease extracelular
espP: gene que codifica a serina protease extracelular
 ETEC: *E. coli* enterotoxigênica
etpD: gene codificador de marcado de sistema de secreção do tipo II
 GC: grupo clonal
 GL: graus Gay-Lussac
 HC: "hemorrhagic colitis" (colite hemorrágica)
 HCT-8: tipo celular de câncer humano
 Hly-EHEC: hemolisina EHEC
 HUS: "hemolytic-uremic syndrome" (síndrome urêmica-hemolítica)
iha: gene codificador de proteína homóloga a IrgA
 IMS: separação imuno-magnética
 IrgA: "iron-regulated gene A"
irp2: gene codificador de sideróforo Yersiniabactina
 IS: índice de similaridade
 kb: kilobase
 kDa: kiloDalton
 LEE: "locus of enterocyte effacement"
*lpf*_{O113}: gene codificador de fimbria polar longa
 MDa: mega Dalton
 μ g: micrograma
 μ L: microlitro

μ M: micromolar
mA: miliampere
mg: miligrama
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
min: minuto
M: molar
nm: nanômetro
pb: pares de base
PBS: solução salina fosfato tamponada
PCR: reação em cadeia da polimerase
PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado
pmol: picomol
pO113: plasmídio de STEC O113
pO157: plasmídio de STEC O157
RAPD: PCR randômico
*rfb*_{O113}: gene envolvido na síntese do antígeno O do sorogrupo O113
rpm: rotação por minuto
saa: gene codificador de adesina autoaglutinante de STEC
Saa: adesina autoaglutinante de STEC
SB: cepa padrão de *Salmonella* ser. Braenderup H9812
SPOT: forma de inoculação
SST3: Sistema de secreção do tipo III
STEC: *E.coli* produtora de toxina Shiga
Stx: toxina Shiga
Stx1: toxina Shiga -1
Stx2: toxina Shiga -2
stx: gene que codifica Stx
stx1 : gene que codifica Stx1
stx2 : gene que codifica Stx2
stx2(variantes): gene que codifica as variantes de Stx
subA: gene codificador de toxina da família das subtilases
TIR: "translocated intimin receptor"
tir: gene codificador da proteína Tir
toxB: gene codificador de adesina ToxB
TAI: ("tellurite resistance and adherence-conferring island")
TBE: tampão Tris-Borato-EDTA
TE: tampão Tris-EDTA
TSA: agar triptcase soja
TSB: caldo triptcase soja
TTP: púrpura trombótica trombocitopênica
U: unidade
UPGMA: agrupamento pareado por médias aritméticas
UV: ultravioleta
Vero: célula de rim de macaco verde africano
UV: ultravioleta
V: Volt
*Xba*I: enzima de restrição

RESUMO

Os ruminantes, especialmente os bovinos, são reservatórios de amostras de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), um enteropatógeno que causa doenças em humanos desde diarreia até colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (HUS). Este microrganismo apresenta elevada persistência no ambiente, variando de semanas a meses. A sua ampla disseminação pode estar associada à contaminação de ambientes aquáticos próximos aos locais de criação dos animais. O sorotipo O113:H21 tem sido isolado de pacientes com HUS e apresenta uma alta ocorrência em animais. Apesar de ser frequentemente isolado no Brasil, este sorotipo ainda não foi relatado causando doenças em humanos. O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização fenotípica e molecular de 29 amostras *rfb*_{O113}-positivas isoladas de bovinos sadios do município de Miracema RJ para avaliar a ocorrência de genótipos potencialmente virulentos para o homem e, também, a manutenção do microrganismo no ambiente. A ocorrência dos genes cromossômicos *stx1*, *stx2*, genes *stx2*, *stx2c*, *stx2d* e *stx2f* das variantes do tipo II da toxina Shiga, *rfb*_{O113}, *iha*, *irp2*, *escC*, *escJ*, *astA*, *cdt-VB*, *lpfA*_{O113} e *efa1 5'* e dos genes plasmidiais *saa*, *espP*, *subA*, *pilS*, *toxB*, *ehxA* e *etpD* foi analisada através de ensaios de PCR. Extração plasmidial foi realizada para caracterização de plasmídios de alto peso molecular. Testes fenotípicos de fermentação do sorbitol, produção de enterohemolisina e efeito citotóxico em células Vero foram realizados. Adicionalmente, testes de amplificação randômica (RAPD) com dois iniciadores distintos e eletroforese de campo pulsado (PFGE) foram realizados, a fim de avaliar a similaridade genética das amostras e sua distribuição e persistência nos animais. Todos os isolados foram positivos para os genes *rfb*_{O113} e *lpf*_{O113}. Com exceção de quatro amostras, todas foram positivas para gene *stx2*, sendo seis também positivas para *stx1*. A ocorrência do subtipo *stx2* isolado foi mais frequente e os fatores de virulência mais comuns foram *iha* (82,7%) seguido por *ehxA* (75,9%). Oito genótipos de virulência foram detectados e dois destes possuíam a ocorrência simultânea de 10 genes. O genótipo mais frequente (n=12) apresentou nove genes de virulência (*stx2* / *stx2v* / *espP* / *pilS* / *saa* / *subA* / *iha* / *ehxA* / *lpf*_{O113}). A maioria das amostras (82,7% e 65,5%) foram fenotipicamente positivas para a fermentação de sorbitol e produção de enterohemolisina, respectivamente. Todas as amostras positivas para genes *stx* demonstraram efeito citotóxico. A presença de plasmídios de alto peso molecular foi comum entre as amostras (69,9%). O menor índice de similaridade entre as amostras foi de 65% e 63% na técnica de RAPD e PFGE, respectivamente. Nas amostras que apresentaram capacidade de persistência e disseminação, também foi observado grande potencial patogênico uma vez que demonstraram perfis de virulência com nove ou dez genes. Algumas diferenças foram encontradas, mas de maneira geral, foi possível detectar a ocorrência de amostras comuns em animais e períodos distintos, inclusive em diferentes rebanhos. Assim como também detectou-se a presença de estirpes não relacionadas no mesmo animal e no mesmo período. O conjunto dos dados obtidos demonstra que, além da elevada ocorrência de genótipos potencialmente patogênicos para o homem, os microrganismos são capazes de permanecer no ambiente e no animal por um longo período ou então

circular no ambiente, inclusive entre rebanhos. A presença comum de STEC O113:H21 no reservatório animal representa um risco que não deve ser negligenciado, ao contrário, investigações mais amplas devem ser realizadas em busca de estirpes de maior potencial patogênico

Palavras-chave: STEC, O113:H21, bovinos, PFGE.

ABSTRACT

Ruminants, specially cattle, are animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), strains that causes human illnesses from mild diarrhea to hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS). These pathogens are capable to survive in the environment from weeks to months and their spread could be associated to farm's water surfaces contamination. The O113: H21 serotype has been isolated from patients with HUS and presents a high occurrence in animals. Although frequently isolated in Brazil from animal sources, this serotype has not yet been detected in human clinical cases. The main objective of the present study was to carry a phenotypic and genotypic characterization 29 *rfb*_{O113}-positive strains of *Escherichia coli* isolated from healthy cattle from Miracema City, Rio de Janeiro, Brazil, in order to determine its virulence profile and genetic relationship. The occurrence of chromosomal-encoded genes *stx1*, *stx2*, genes *stx2*, *stx2c*, *stx2d* and *stx2f* variants, *rfb*_{O113}, *iha*, *irp2*, *escC*, *escJ*, *astA*, *cdt-VB*, *lpfA*_{O113} and *efa1 5'* and plasmidial-encoded genes *saa*, *espP*, *subA*, *pilS*, *toxB*, *ehxA* and *etpD* was searched through PCR assays. The presence of high molecular weight plasmids were analyzed by plasmidial extraction. Phenotypic assays for detection of sorbitol-fermenting and enterohemolytic-producing strains were carried. Additionally, RAPD assays with two random primers and PFGE assays had been carried through to evaluate the persistence and dissemination of these pathogens. All isolates were positive for *rfb*_{O113} and *lpf*_{O113} genes. Most of isolates (86.2%) were positive for *stx2* gene, and six of them were simultaneously positive for *stx1*. The *stx2* subtype of Shiga toxin was the most common variant presented and *iha* and *ehxA* had the highest frequencies (82.7% and 75.9%, respectively). Eight distinct genotypes were detected and two of them presented simultaneous occurrence of 10 virulence genes. The most frequent virulence genotype was *stx2* / *stx2v* / *espP* / *pilS* / *saa* / *subA* / *iha* / *ehxA* / *lpf*_{O113}. The majority of the strains were phenotypically positive for sorbitol fermentation and enterohemolysin production (82.7% and 65.5%, respectively) and all *stx*-positive strains presented citotoxic effects in Vero cells assays. The presence of high molecular weight plasmids was common among the isolates (69.9%). The minimum similarity index of the strains was 65% and 63% for both RAPD and PFGE techniques respectively. It was observed a great pathogenic potential in strains with persistence and spreading abilities since they presented as much as ten virulence markers simultaneously. Some differences were observed in the results provided by these assays but, in a general manner, the occurrence of identical strains in distinct animals, time even farms could be detected. The presence of unrelated strains in a single animal at the same time was also observed. The data obtained in this study revealed that these pathogens, besides their high occurrence of potentially virulent genotypes to humans, are capable to persist in the environment or animal for a long time or to disseminate even in distinct farms. The common presence of STEC O113: H21 in the animal reservoir represents a risk that cannot be neglected; otherwise, broader inquiries must be carried out to search to lineages of greater pathogenicity.

Key-words: STEC, O113:H21, cattle, PFGE.

1 Introdução

Diversas amostras de *Escherichia coli* são consideradas enteropatogênicas e apresentam potencial zoonótico, sendo transmitidas ao homem, principalmente, através de alimentos. Dentre os patótipos descritos, podemos destacar as *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), com distribuição cosmopolita e conhecidamente capazes de causar quadros graves de diarreia e sequelas sistêmicas como a síndrome urêmica-hemolítica (HUS). No grupo das STEC são descritos diversos sorogrupos, dentre os quais destacam-se O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 e O157 por estarem mais frequentemente associados a doenças humanas.

STEC apresentam reservatórios animais, principalmente bovinos. A sua capacidade de manutenção no hospedeiro e sobrevivência no ambiente é grande, quando comparada com outros patótipos, o que possibilita a recolonização do hospedeiro e aumenta o risco de contaminação cruzada. STEC do sorogrupo O113 é comumente isolada de bovinos, sendo este sorogrupo caracterizado como o prevalente na Austrália. Além disso, amostras deste sorogrupo, em particular do

sorotipo O113:H21, são descritas como causadoras de casos esporádicos e surtos de HUS.

A virulência de STEC está principalmente relacionada à ação da toxina Shiga e a uma alteração da mucosa intestinal denominada lesão “attaching and effacing” (A/E) expressa tipicamente em amostras do patotipo EPEC e comum em diversas amostras STEC. A maioria das cepas do sorogrupo O113, no entanto, não carregam os genes necessários para a expressão desta lesão.

Diversos potenciais fatores de virulência, incluindo adesinas, outras toxinas, mecanismos quimiotáticos e de invasão, têm sido descritos em amostras STEC O113 como prováveis formas de compensar a ausência da lesão “attaching and effacing” (A/E).

Diferentemente de STEC O157, o sorotipo O113:H21 é bastante freqüente em reservatórios animais no Brasil. Entretanto, apesar desta ocorrência elevada, não há conhecimento de nenhum caso relatado de doenças em humanos provocadas por este sorotipo. Desta forma, são necessários estudos que possibilitem o melhor esclarecimento sobre o perfil de virulência de amostras STEC O113, facilitando a determinação do papel deste sorogrupo quanto à infecção em humanos no Brasil.

2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar amostras *rfb*_{O113}-positivas oriundas de material fecal, analisadas em 2002/2003 e 2008, de bovinos sadios de três rebanhos do município de Miracema, RJ, quanto ao seu perfil de virulência e relação genética.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos buscou-se: a) caracterizar fenotípica e genotípicamente perfis de virulência associados a potenciais fatores de agressão; b) determinar e comparar a relação genética das amostras através de ensaios moleculares de amplificação randômica de DNA e gel de eletroforese de campo pulsado.

3 Revisão de literatura

Escherichia coli, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram negativo, móvel ou imóvel, anaeróbio facultativo presente em grande número no intestino grosso de mamíferos e aves domésticas e selvagens, onde desempenha como espécie comensal da microbiota, um importante papel na fisiologia digestiva (LEVINE *et al*, 1987). A maioria das amostras é constituída por microrganismos comensais; porém, diversas amostras patogênicas são reconhecidas. Sendo assim, além de seu papel como indicador de contaminação fecal, pode-se destacar *Escherichia coli* como um causador de doenças em animais e no homem, sejam infecções intestinais (enteropatógenos) ou extra-intestinais.

Diversas amostras enteropatogênicas de *E.coli* apresentam uma espécie-especificidade, não demonstrando importância na transmissão animal-homem. No entanto, na década de 80 essa preocupação surgiu com um surto de doença gastrointestinal, colite hemorrágica (HC) e síndrome urêmica hemolítica (HUS), ocorrido nos Estados Unidos, quando um tipo, até então incomum, fora isolado

(O157:H7). Tal surto foi associado à ingestão de hambúrguer bovino mal cozido. O fato desta bactéria, comum às fezes dos animais, ser detectada em alimentos, indicou um potencial zoonótico da amostra (RILEY *et al*, 1983). A capacidade de sobreviver ao baixo pH do estômago e a baixa dose infectante, onde são necessárias apenas 10 células para a colonização do trato intestinal de humanos, permitem que essas amostras atuem como um patógeno de origem alimentar (RILEY *et al*, 1983; GORDEN & SMALL, 1993).

Entre as amostras enteropatogênicas de *E. coli* são descritos seis patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) causadora da lesão “attaching and effacing” (A/E); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que produz a toxina Shiga e causa a lesão A/E; *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) que produz enterotoxinas termo-lábil e/ou termo-estável; *E. coli* enteroinvasora (EIEC) que invade o epitélio colônico humano; *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998). O grupo das STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga) inclui as amostras EHEC, associadas a doença humana severa e demais amostras produtoras da toxina Shiga.

3.1 Epidemiologia de STEC

Bovinos são considerados o principal reservatório de STEC. A maioria destes animais é, supostamente, exposta a este microrganismo ao longo da vida, uma vez que anticorpos circulantes contra este patógeno são normalmente encontrados

(PIRRO *et al*, 1995). Outros estudos consideram, também, ovinos e suínos como possíveis reservatórios de O157:H7 e outras STEC não-O157 (BOOHER, CORNICK & MOON, 2002; KIM *et al*, 2002; WANI *et al*, 2003). Estudos detectaram a presença destas amostras patogênicas no trato intestinal de equinos, caninos, caprinos e cervídeos (BEUTIN *et al*, 1993; PATON & PATON, 1998; STAATS *et al*, 2003; WANI *et al*, 2004).

STEC é mais freqüente em bovinos de regime leiteiro em decorrência de um manejo mais intensivo destes animais que sofrem uma maior exposição às fezes no curral do que os animais do regime de corte (POTTER, TAUXE & WACHSMUTH, 1991). Devido a este fato, STEC é, geralmente, transmitida ao homem através de alimentos contaminados, direta ou indiretamente, por material fecal e, principalmente, por produtos cárneos crus ou mal cozidos e lácteos não-pasteurizados, em especial, de origem bovina (DOYLE & SCHOENI, 1987; ELDER *et al*, 2000; BARKOCY-GALLAGHER *et al*, 2003).

O processo de corte da carne pode ser responsável pela contaminação cruzada de outros alimentos com STEC. Estudos já demonstraram que aves (frango e peru) podem ser reservatórios de *E. coli* multi-resistentes a diversos antimicrobianos, havendo a possibilidade de infecção a partir do consumo da carne destes animais (BLANCO *et al*, 2004). Vários tipos de carne podem veicular a doença, dentre estas, o hambúrguer de carne bovina (RYLEY *et al*, 1983), as carnes de suínos, de frangos e de ovinos (DOYLE, PADHYE & ZHAO, 1989), além de carne-moída, rosbife, salame, leite (GRIFFIN, 1998). Amostras STEC têm sido isoladas de suínos e alguns alimentos de origem suína envolvidos em infecções humanas (CDC, 1995; BARLOW *et al*, 2000; BOUVER *et al*, 2001). A contaminação

fecal de água também pode conduzir a infecção. O contato direto é um outro modo de transmissão pela via fecal-oral (GRIFFIN, 1998), inclusive através de portadores assintomáticos.

Cepas de STEC em animais aparentemente saudáveis podem significar um problema relacionado à contaminação cruzada durante o abate e estudo em diversos países investigaram a ocorrência destes microrganismos como fontes de infecção humana (BORCZYK *et al*, 1987; CHAPMAN, WRIGHT & CHAPMAN, WRIGHT & HIGGINS, 1993; MARTIN *et al*, 1996;). Amostras foram isoladas de casos esporádicos e de surtos na América do Norte (PRESTON *et al*, 2000; DAVIS *et al*, 2003; NOLLER *et al*, 2003) e na Europa (ALLISON, CARTER & THOMPSON-CARTER, 2000; LIESEGANG *et al*, 2000; BIDEET *et al*, 2005). Na Austrália, STEC foi isolada em 13% das amostras de fezes bovinas (ROBINS-BROWNE, ELLIOTT & DESMARCHELIER, 1998).

No Chile, apesar de a ocorrência de STEC coletadas em bovinos nos abatedouros ser igual a 34%, os suínos aparentam ser o principal reservatório deste microrganismo, com 69% de animais colonizados (RIOS *et al*, 1999). Na Argentina, STEC está presente em torno de 16,3% em gado de corte (LÓPEZ, CONTRINI & ROSA, 1998) e, também, em 64% em gado confinado (PADOLA *et al*, 2004). A alta prevalência de STEC em animais ocorre, normalmente, em países onde doenças humanas associadas à STEC são frequentes (WELLS *et al*, 1991; BEUTIN *et al*, 1993). Entretanto, em países como Espanha e Índia, há uma elevada ocorrência de STEC em animais e alimentos; porém, uma baixa incidência de casos em humanos (BLANCO *et al*, 1996; KHAN *et al*, 2002).

No Brasil, amostras STEC foram detectadas através de ensaios de PCR em fezes de gado sadio originário de municípios vizinhos à cidade do Rio de Janeiro, quando foram encontradas, pela primeira vez no Brasil, cepas de O157:H7 (CERQUEIRA *et al*, 1999). A ocorrência STEC isolada de carne moída crua, coletadas no Rio de Janeiro e em São Paulo, foi de 20% e 3,5%, respectivamente (CERQUEIRA, TIBANA & GUTH, 1997; BERGAMINI *et al*, 2007). Um estudo com 190 amostras de carcaça de frango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro levou ao isolamento de duas cepas de STEC (GONZALEZ *et al*, 2000). JOAQUIM *et al* (2001) demonstraram, em uma investigação de 1221 amostras fecais de bovinos sadios, também no Rio de Janeiro, que 61% dos animais carregavam STEC. Em 2007, OLIVEIRA *et al* relataram, pela primeira vez na América do Sul, a ocorrência de STEC em amostras fecais de búfalos, em fazendas em Minas Gerais, onde a taxa de prevalência variou de zero a 64%. Observou-se uma alta ocorrência (57,5%) de STEC em amostras fecais de cabras e, também, gado leiteiro e de corte (17,5% e 39,2%, respectivamente) (OLIVEIRA *et al*, 2008).

No Estado de São Paulo, houve o isolamento de STEC em 52,1% de fezes de ovinos sadios (VETTORATO *et al*, 2003) e, em Campinas, a presença de STEC em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia foi igual a 32% e 19% (COELHO, FURUMURA & YANO, 1995; SALVADORI, DELLA COLLETA & YANO, 1997). A ocorrência de STEC em amostras de leite, oriundas de bovinos com mastite, foi de 12,8% (LIRA, MACEDO & MARIN, 2004). Outro estudo verificou que 25,5% dos bovinos provenientes de seis fazendas leiteiras no Estado de São Paulo carregavam STEC nas fezes (IRINO *et al*, 2005).

No Rio Grande do Sul, MOREIRA *et al* (2003) avaliaram a produção de toxina Shiga em amostras isoladas de bovinos e a taxa de detecção foi 95% dos rebanhos (57 de 60) e 49% (119 of 243) dos bovinos estudados. Já no Paraná, foi detectada uma alta ocorrência (57%) de STEC em amostras fecais de bovinos (FARAH *et al*, 2007).

3.2 Persistência de STEC no animal e no ambiente

Fatores ambientais são citados como possíveis causadores de infecções ou reinfecções de animais por STEC, principalmente bovinos que são o principal reservatório destes microrganismos. A água, clima, solo, umidade e tipo de manejo são os principais fatores influenciadores da ocorrência de STEC em material fecal bovino (FAITH *et al*, 1996; GARBER *et al*, 1999).

Amostras STEC possuem, em geral, uma marcante capacidade de sobrevivência no ambiente quando excretadas nas fezes bovinas, fazendo com que sejam importante fonte de reinfecção do gado e possível fonte de contaminação do ambiente (GUDONG, ZHAO & DOYLE, 1996).

O gado está suscetível a adquirir amostras STEC durante o processo de ruminar o pasto e, conseqüentemente, contaminar o bebedouro com estas amostras (RICE & JOHNSON, 2000; LEJEUNE *et al*, 2001a). Estudos demonstram que a contaminação fecal dos bebedouros é um fato comum nas fazendas (LEJEUNE, BESSER & HANCOCK, 2001; SARGEANT *et al*, 2003).

Alguns estudos determinaram a viabilidade de sobrevivência de amostras STEC O157:H7 na superfície de ambientes aquáticos como lagos (WANG & DOYLE, 1998), rios (TANAKA, YAMAGUCHI & NASU, 2000), água de fazendas (MCGEE *et al*, 2002) e bebedouros de animais (RICE & JOHNSON, 2000), comprovando a importância destas amostras como contaminantes de água.

E. coli O157 é um agente que persiste nas fazendas contaminando os bovinos e sendo isolada repetidamente de vários pontos da fazenda por vários anos (HANCOCK *et al*, 1997, MECHIE, CHAPMAN & SIDDONS, 1997).

Para entender melhor a sobrevivência e persistência de STEC no ambiente, diversos estudos foram feitos com inoculação experimental em bezerros e gado adulto e observou-se que a liberação do microrganismo é muito maior nas duas primeiras semanas após a inoculação (CRAY & MOON, 1995; BROWN *et al*, 1997; HARMON *et al*, 1999). Bezerros, no geral, continuam liberando o microrganismo por um tempo muito maior do que adultos e a infecção pode persistir por diversos meses (CRAY & MOON, 1995).

A prática, comum em alguns países, de uso de excrementos de animais agropecuários para a fertilização do solo pode potencializar a disseminação do microrganismo no ambiente. Um estudo na França relatou uma ocorrência de 10% de amostras STEC O157 em excrementos a serem utilizados nesta prática (VERNOZY-ROZAND *et al*, 2002) e cepas deste sorogrupo são capazes de sobreviver por pelo menos 12 semanas neste material (MCGEE *et al*, 2001). KUDVA, BLANCH & HOVDE (1998) demonstraram que amostras STEC O157:H7 sobreviveram por 47 dias em amontoados de estrume de vacas expostos a mudanças climáticas. MAULE (2000) demonstrou que amostras STEC O157 foram

capazes de sobreviver por 99 dias em condições naturais (superfície da grama no campo).

Adicionalmente, foram realizados estudos que avaliavam a capacidade de amostras STEC sobreviverem a diferentes condições físicas e químicas, através da inoculação artificial destas amostras em excrementos bovinos. Amostras STEC O26, sorogrupo associado a doenças em humanos, foram detectadas após três meses a inoculação sem nenhuma alteração genética (FREMAUX *et al*, 2007).

3.3 Virulência e patogenia de STEC/EHEC

Diversos sorotipos de *E. coli* podem produzir a toxina Shiga; porém, nem todos podem provocar a doença em humanos. Os sorotipos de STEC, freqüentemente, envolvidos em doenças humanas graves, como CH e HUS, foram classificados como amostras EHEC, que além de produzirem a toxina Shiga, apresentam ainda a capacidade de produzir a lesão A/E na mucosa intestinal do hospedeiro e, também, a expressão da enterohemolisina (Ehly) ou hemolisina EHEC (Hly-EHEC). Estas amostras fazem parte de um subgrupo patogênico das STEC, que carrega uma ilha de patogenicidade chamada locus LEE. Nesta ilha estão genes envolvidos em todo o mecanismo para a produção da lesão A/E, o que determina maior gravidade dos quadros clínicos. Tais quadros caracterizam-se por dores abdominais, diarreia aquosa progredindo rapidamente a sanguinolenta (NATARO & KAPER, 1998). Em casos mais graves, pode haver a evolução sistêmica do quadro

causando síndrome urêmica-hemolítica (HUS). Esta síndrome ocorre cerca de uma semana após o início do quadro diarréico e caracteriza-se por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e falha renal aguda devido à ação de toxinas e danos endoteliais (DONNENBERG, 2002). O comprometimento é de cerca de 10% dos pacientes, especialmente crianças, idosos e imunodeprimidos (PATON & PATON, 2000).

Os sorogrupos mais relatados em casos de infecções por EHEC são O157, O26, O55, O103, O111 e O128 (CAPRIOLI *et al*, 1994; LUDWING *et al*, 1996, PATON & PATON, 1996; TARR & NEILL, 1996), sendo todas elas amostras LEE-positivas. Entretanto, algumas amostras de STEC, apesar de não carregarem o locus LEE, são capazes de provocar quadros graves e, inclusive, surto de HUS (PATON *et al*, 1999).

A toxina Shiga apresenta uma estrutura comum a várias toxinas bacterianas de origem protéica, representada pelo modelo 1A:5B, no qual a subunidade A1 é responsável pela clivagem do RNA ribossomal e as subunidades B, pela ligação da toxina com o receptor nas células-alvo (MELTON-CELSA & O'BRIEN, 1998). Pode ser subdividida nos tipos 1 (Stx1) e 2 (Stx2).

A produção isolada de Stx2 tem sido associada a quadros mais graves de doenças humanas do que quando se produz apenas o tipo 1 ou ambos (KLEANTHOU *et al*, 1990). Esses tipos são codificados pelos genes *stx1* e *stx2*, presentes em fagos lisogênicos distintos (O'BRIEN & HOLMES, 1987). São conhecidas algumas variantes desses tipos de Stx: Stx1 e Stx1c (ZHANG *et al*, 2002), Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2d ativa, Stx2e, Stx2f e Stx2g (KARCH *et al*, 2005), além de outras variantes menos freqüentes de Stx2, algumas vezes, restritas a uma

única cepa de STEC (CAPRIOLI *et al*, 2005). Os diferentes tipos de Stx apresentam variações quanto à sua potência, possivelmente relacionados a maior ou menor afinidade pelo receptor na superfície celular e/ou a maior eficiência no transporte intra e extracelular.

Além da toxina Shiga, STEC possui outros fatores de virulência e diferentes ilhas de patogenicidade (HACKER & KAPER, 2000), e entre elas destaca-se a chamada região LEE (“Locus of enterocyte effacement”), primeiramente descrita em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) como uma região cromossômica de aproximadamente 35kb (MCDANIEL *et al*, 1995; PERNA *et al*, 1998).

A lesão “attaching and effacing” (A/E), classificada primeiramente em amostras de EPEC, é caracterizada basicamente pela destruição das microvilosidades, aderência íntima entre a bactéria e a membrana da célula hospedeira com o acúmulo de filamentos de actina e conseqüentemente formação de uma estrutura semelhante a um pedestal sob a bactéria. Os genes bacterianos, como *eae* e *tir* (marcadores genéticos da proteína intimina e do seu receptor Tir, respectivamente), responsáveis por esta lesão A/E estão na região LEE (NATARO & KAPER, 1998; FRANKEL *et al*, 1998). STEC que não carregam o gene *eae* podem estar associadas a infecções, inclusive quadros de HUS e CH, indicando que a intimina não é essencial para que ocorra a doença (LOUIE *et al*, 1994). Algumas destas cepas que não causam lesão A/E, entretanto, podem apresentar destruição de microvilosidades, sugerindo que haja um outro fator de virulência capaz de suprir a deficiência de *eae*.

Além da região LEE, STEC possui outras ilhas de patogenicidade cromossômicas como a ilha OI-43 ou TAI (“tellurite resistance and adherence-

conferring island”), na qual encontra-se o gene *iha* responsável pela codificação da proteína homóloga a proteína IrgA (“iron-regulated gene A”) de *Vibrio cholerae*, que confere aderência a cepa laboratorial não-aderente de STEC (KARMALI *et al*, 2003). Outra ilha de patogenicidade, distante de LEE e integrada ao locus tRNA *pheV* em STEC é denominada OI-122 ou SpLE3. Um dos genes de virulência que esta ilha carrega é denominado *efa1*, que induziria, *in vivo*, a colonização do intestino bovino e a ocorrência de diarreia em bezerros (STEVENS *et al*, 2002; KARMALI *et al*, 2003).

Em STEC, também pode ser observada a ocorrência de uma enterotoxina termo-estável EAST1, similar a toxina termo-estável de ETEC (STa). EAST1 foi primeiramente descrita em amostras EAEC (SAVARINO *et al*, 1991; SAVARINO *et al*, 1996). O papel desta enterotoxina ainda não é bem conhecido, mas admite-se que contribua na diarreia não sanguinolenta que ocorre no estágio inicial da doença (SAVARINO *et al*, 1996).

Os genes *escC* e *escJ* são genes conservados do sistema de secreção do tipo III (SST3) de amostras EPEC e EHEC. Codificam proteínas estruturais deste sistema, sendo considerados bons marcadores da existência deste tipo de secreção. Tais genes também podem ser encontrados em outras categorias de *E. coli* diarreio-genicas (KYAM *et al*, 2003).

Moléculas extracromossomais de DNA, conhecidas como plasmídios, são encontradas em diversas espécies bacterianas e alguns possuem genes de virulência, sendo, normalmente, de alto peso molecular. Muitos marcadores de virulência codificados em plasmídios são alvos de diagnóstico molecular e subtipagem de amostras patogênicas (NATARO & KAPER, 1998). A localização dos genes nos plasmídios possibilita uma transferência horizontal, se os plasmídios

forem conjugativos. Um estudo demonstrou que, diferente do que acontece com amostras EHEC O157:H7, há uma grande variabilidade genética entre os plasmídios de amostras não-O157 (BRUNDER *et al*, 1999). Estas amostras EHEC O157:H7 são descritas como tendo uma deficiência na transferência de plasmídios, o que explicaria a pouca variabilidade genética nos plasmídios (HALES *et al*, 1992; MAKINO *et al*, 1998).

Dentre os marcadores de virulência plasmidiais, podemos citar os genes responsáveis pela codificação da citotoxina denominada enterohemolisina, EHEC-hemolisina ou E-Hly, (*ehxA*) e uma serina-protease (EspP), proteína auto-transportadora codificada pelo gene *espP* que clivaria o fator V da coagulação humana. Eles estão presentes em um plasmídio de aproximadamente 60 MDa (BURLAND *et al*, 1998; LEBLANC, 2003).

A citotoxina E-Hly foi descrita primeiramente em EPEC (BEUTIN *et al*, 1988) sendo, posteriormente, descrita em STEC (BEUTIN *et al*, 1989). Esta citotoxina pertence à família RTX (citotoxinas formadoras de poro), sendo distinta da α -hemolisina (α -Hly) (BEUTIN *et al*, 1988; BEUTIN *et al*, 1989; SCHMIDT, BEUTIN & KARCH, 1995). A “hemolisina EHEC” (EHEC-Hly), produz uma zona de hemólise pequena e turva em ágar sangue lavado de carneiro (BEUTIN *et al*, 1988), estando a sua produção fortemente associada com a produção de Stx, colaborando na infecção através da liberação de hemoglobina como fonte de ferro para o crescimento de STEC no intestino (LAW, 2000).

Uma adesina autoaglutinante de STEC (*saa*), codificada em plasmídio de alto peso molecular, foi identificada em STEC LEE-negativas do sorotipo O113:H21, mostrando uma forte associação com amostras enterohemolíticas (PATON *et al*,

2001). Ela seria capaz de mediar a aderência bacteriana a células epiteliais *in vitro*. Relaciona-se mais com STEC LEE-negativas de origem bovina do que de origem humana (JENKINS *et al*, 2003).

O gene *toxB* localiza-se em um plasmídio de aproximadamente 93 Kb (pO157) e contribui para a aderência de amostras EHEC ao epitélio intestinal, promovendo a produção e secreção de proteínas envolvidas no sistema de secreção do tipo III. Estudo com amostras mutantes para o plasmídio pO157 demonstrou que os níveis de proteínas como EspA, EspB e Tir diminuíram e que, apesar de haver o desenvolvimento de microcolônias, o número também foi bem reduzido. Introduzindo um mini-plasmídio pO157, contendo as regiões *ori* e *toxB*, a capacidade de aderência e os níveis de produção e secreção de proteínas foram restaurados (TATSUNO *et al*, 2001).

O gene *etpD* é um marcador da presença do sistema de secreção do tipo II e está presente em pO157 e em plasmídios de alto peso molecular de amostras STEC não-O157. Além de ser encontrado em todas as amostras STEC O157, pode ser detectado em 60% de amostras STEC LEE-positivas e em 10%, LEE-negativas (SCHMIDT, HENKEL & KARCH, 1997).

3.4 STEC do Sorotipo O113:H21

Os diversos sorogrupos de *E. coli* podem ser divididos em dois grupos: as STEC LEE-positivas, em especial os sorogrupos O157 e O111, e as LEE-negativas.

Estas, por não produzirem a lesão A/E, aparentemente são menos virulentas. Entretanto, diversos casos esporádicos de HUS e CH associados à STEC LEE-negativas já foram descritos (KESKIMÄKI *et al*, 1997; BONNET *et al*, 1998; PATON & PATON, 1998b; BOERLIN *et al*, 1999). Destas amostras, o sorogrupo mais comumente associado a doenças em humanos é o O113, particularmente o sorotipo O113:H21 (KARMALI, 1989; PATON & PATON, 1998b) que já foi relacionado a um surto em Adelaide, sul da Austrália (PATON *et al*, 1999).

Estudos na França (PRADEL *et al*, 2000), Japão (KOBAYASHI *et al*, 2001) e Espanha (BLANCO *et al*, 1996b; BLANCO *et al*, 1997; ORDEN *et al*, 1998) demonstraram que O113:H21 é o sorotipo prevalente recuperado de fezes bovinas. Na Austrália, este sorotipo foi o predominante em amostras STEC Stx2-positivas isoladas de gado sadio (HORNITZKY *et al*, 2002).

Apesar de não possuir o locus LEE, que confere uma aderência íntima da bactéria, amostras de STEC O113:H21 são capazes de aderir ao epitélio intestinal. Entretanto, exibem um padrão distinto de aderência àquele apresentado por amostras LEE-positivas como EPEC e EHEC O157 (DYTOC *et al*, 1994), uma vez que demonstram aderência às microvilosidades, mas sem recrutamento detectável de elementos do citoesqueleto. Além disso, já foi relatada a internalização de amostras STEC O113:H21 em células epiteliais de ovário de hamster chinês (CHO-K1), diferentemente de amostras de EHEC O157:H7 que permaneceram aderidas extracelularmente à superfície epitelial (LUCK *et al*, 2005). Este mesmo estudo também demonstrou que STEC O113:H21 foi capaz de invadir células humanas como Caco-2 e HCT-8, sugerindo que amostras LEE-negativas podem empregar mecanismos de invasão para colonizar a mucosa intestinal do hospedeiro.

Diversos estudos já demonstraram formas alternativas de, provavelmente, compensar a ausência do locus LEE, como uma adesina autoaglutinante de STEC (Saa), codificada pelo gene *saa* presente em plasmídio de alto peso molecular, que foi descrita em amostras STEC O113:H21 (PATON *et al*, 2001). Outro grupo identificou genes relacionados com uma fimbria longa polar em STEC O113:H21 em uma região no cromossomo composta por quatro seqüências de leitura abertas, *lpfA* a *lpfD* (DOUGHTY *et al*, 2002). A ocorrência desta fimbria em amostras STEC O113:H21 é bastante comum e também pode ser detectada em outros sorotipos (TOMA *et al*, 2004).

PATON *et al* (2004) descreveram, em amostras STEC O113:H21, a produção de uma nova citotoxina, cujo efeito deletério *in vivo* e a potente citotoxicidade ocorre devido a uma atividade “subtilase”. Essa citotoxina, codificada pelo gene *subA*, pertence a família das “subtilases”, que são serino proteases encontradas em um amplo número de microrganismos (SIEZEN *et al*, 1991; SIEZEN & LEUNISSEN, 1997).

O gene *pilS* codifica a subunidade estrutural de um *pilus* do tipo IV encontrado em megaplasmídio pO113 de STEC O113:H21. Sua ocorrência é associada a amostras LEE-negativas (SRIMANOTE, PATON & PATON, 2002).

O gene *cdt-VB* corresponde ao alelo V da toxina CDT (subunidade B). A variante CDT-V foi descrita em STEC SFO157:NM, em apenas 6% das STEC O157:H7 e em poucos sorotipos, como O113:H21, de STEC LEE-negativas (BIELASZEWSKA *et al*, 2004).

3.5 Diagnóstico e subtipagem molecular de STEC

Uma das principais formas de diagnóstico laboratorial para STEC é a pesquisa direta do gene *stx* através da reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”, PCR) de reconhecida sensibilidade. A pesquisa direta do gene é utilizada principalmente porque o número de STEC presente em amostras clínicas e ambientais é muito reduzido, o que dificulta as técnicas habituais de isolamento primário. Além disso, a PCR pode ser utilizada na pesquisa de diversos marcadores de virulência em um mesmo teste (PCR no formato multiplex) como os genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *ehxA* (GANNON *et al*, 1993; SCHMIDT, BEUTIN & KARCH, 1995; FAGAN *et al*, 1999; PATON & PATON, 2002). Para busca específica de determinadas amostras STEC, a pesquisa por outros genes característicos deste patotipo, como genes associados à síntese do antígeno O, tais como *rfb*_{O157}, *rfb*_{O111}, pode ser utilizada (PATON & PATON, 2002).

O uso de culturas de células Vero, apesar de trabalhoso, demorado e oneroso, continua sendo uma importante ferramenta para a confirmação de expressão e funcionalidade da toxina, e também para o teste de neutralização por anticorpos anti-Stx1 e anti-Stx2 (SMITH & SCOTLAND, 1988).

Para fins de isolamento, a separação imunomagnética (IMS) tem sido utilizada com sucesso em certas STEC, principalmente as pertencentes aos sorogrupos O157 e O111. Este sistema consiste em esferas magnéticas recobertas com anticorpo dirigido para os antígenos, resultando na ligação da bactéria ao

anticorpo, seguindo-se de separação do complexo antígeno-anticorpo pelo emprego de um campo magnético (OLSVIK *et al.* 1994; SAFARIK, SAFARIKOVA & FORSYTHE, 1995; SAFARIK & SAFARIKOVA, 1999).

A tipagem molecular tem como principal finalidade diferenciar cepas dentro de um mesmo sorotipo, assim como analisar uma provável origem comum, sendo um ensaio de grande importância epidemiológica. Os métodos de tipagem molecular de alta resolução baseados na análise do polimorfismo de genoma completo têm contribuído para o estudo de muitos agentes infecciosos.

A PCR é bastante utilizada uma vez que é de fácil execução e requer pequenas quantidades de DNA. Dentre as técnicas baseadas na PCR, a amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) destaca-se pela simplicidade, uma vez que utiliza apenas um pequeno iniciador inespecífico, que pode parear com qualquer região do genoma, obtendo um conjunto de fragmentos de tamanho variável (WILLIAMS *et al.*, 1990), sendo importante em estudos com objetivos evolutivos e epidemiológicos (WANG *et al.*, 1993).

Perfil de macro-restrição detectado através de eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (“pulsed field gel eletrophoresis” – PFGE) é uma técnica que emprega microrganismos embebidos em agarose, que são lisados *in situ* expondo seu DNA. Enzimas de restrição são utilizadas na clivagem do DNA cromossômico, reconhecendo sítios pouco freqüentes no genoma, o que leva a fragmentos que são separados em gel de agarose (MASLOW, SLUTSKY & ARBEIT, 1993).

Os perfis gerados por RAPD e PFGE são analisados por programas específicos gerando um dendrograma com base nas semelhanças relativas entre os indivíduos (NEI, 1987).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas e condições gerais de isolamento

Foram estudados 29 isolamentos de *rfb*-O113 pertencentes à coleção do Laboratório de Enteropatógenos da UFF (Tabela 01).

Destes isolamentos, sete foram selecionados dentre um conjunto previamente obtido em um levantamento prospectivo da ocorrência de STEC em amostras fecais de bovinos sadios de três fazendas do município de Miracema no Estado do Rio de Janeiro, quando 72 animais foram analisados mensalmente durante doze meses (JOAQUIM, 2004, MATHEUS-GUIMARÃES, 2006).

Outras 13 cepas foram isoladas de suspensões polimicrobianas obtidas de amostras fecais oriundas do mesmo estudo citado anteriormente (JOAQUIM, 2004). Para o isolamento, foram selecionadas as coletas cujas suspensões (n=105) foram positivas para o gene *rfb*_{O113}, envolvido na síntese do antígeno O.

Nove isolamentos foram obtidos de uma nova coleta realizada no rebanho 03 no mês de março de 2008. Vinte animais sadios foram estudados, dos quais dez foram randomicamente selecionados no estudo anterior (JOAQUIM, 2004) e o restante era descendente direto de outros animais.

Tabela 01 – Isolamentos de *E. coli rfb O113* provenientes de amostras fecais de bovinos sadios de Miracema, RJ caracterizados no presente estudo.

Amostra	Faixa Etária	Rebanho	Coleta	Coleta (referência)	Isolamento (referência)	Caracterização (referência)
M01	Bezerro	1	out/02	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
M02	Bezerro	1	out/02	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
M03	Bezerro	1	jun/03	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
M04	Bezerro	1	ago/03	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
M05	Bezerro	1	mai/03	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M06	Bezerro	1	mai/03	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M07	Bezerro	1	mai/03	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M08	Bezerro	1	mai/03	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M09	Bezerro	1	jun/03	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
M10	Bezerro	1	jul/03	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M11	Adulto	1	nov/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M12	Adulto	1	nov/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
M13	Adulto	1	nov/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
T01	Novilho	2	mar/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
T02	Novilho	2	abr/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
B01	Adulto	3	set/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
B02	Adulto	3	nov/02	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
B03	Adulto	3	dez/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
B04	Adulto	3	dez/02	(JOAQUIM, 2004)	neste estudo	neste estudo
B05	Adulto	3	out/02	(JOAQUIM, 2004)	(JOAQUIM, 2004)	(MATHEUS-GUIMARÃES, 2006) e neste estudo
B06	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B07	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B08	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B09	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B10	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B11	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B12	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B13	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo
B14	Adulto	3	mar/08	neste estudo	neste estudo	neste estudo

4.2 Coleta de amostras

O procedimento utilizado foi o mesmo para o período de 2002/2003 e 2008. As amostras fecais foram coletadas com o auxílio de “swab” estéril introduzido na ampola retal dos animais, acondicionado em meio Cary Blair (Britânia, Buenos Aires, Argentina) e transportado em recipiente isotérmico a 4°C até o laboratório de Enterobactérias do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense para processamento em um período não superior a 72 horas após a coleta.

4.3 Processamento das amostras coletadas em 2008

As amostras coletadas no ano de 2008 foram semeadas em placas com meio “Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient” (CLED - Britânia, Buenos Aires, Argentina) através de espalhamento em superfície, para obtenção de crescimento confluyente, e incubadas por 18-24 horas a 37°C.

O crescimento foi ressuspenso em 2mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 e uma alíquota de 500µL foi adicionada a um microtubo contendo 500µL de TSB em dupla concentração com 20% de glicerol, sendo estocada em freezer a -20°C.

Uma alíquota de 100 μ L da suspensão foi diluída em um microtubo contendo 900 μ L de PBS e homogeneizada em vortex, sendo aquecida a 100°C por 10 minutos para lise celular e extração do DNA bacteriano. Após rápida centrifugação, o material foi congelado a -20°C e depois testado para a presença do gene *rfb*_{O113} (Tabela 01).

4.4 Isolamento de colônias *rfb*_{O113}-positivas

As suspensões em estoque positivas para o gene *rfb*_{O113} foram reativadas em 2 mL de Caldo Trypticase Soja (TSB - Britânia, Buenos Aires, Argentina) e incubadas por 18-24 horas a 37°C, sendo, posteriormente, semeadas em Agar MacConkey (Britânia, Buenos Aires, Argentina) e novamente incubadas nas mesmas condições anteriores.

Colônias típicas de *E. coli*, mínimo de 20 e máximo de 400, foram selecionadas e repicadas em "SPOT", para placa de Agar Trypticase Soja (TSA – Britânia, Buenos Aires, Argentina), incubando-as por 18-24 horas a 37°C.

Do crescimento obtido foram preparados "pools" de 10 colônias da mesma amostra em microtubos com 200 μ L de PBS estéril. A extração do DNA foi procedida da mesma forma como citado anteriormente e os "pools" extraídos foram submetidos à reação de amplificação para o gene *rfb*_{O113} e, aqueles que apresentassem sinal positivo, eram refeitos numa quantidade de cinco e finalmente com uma colônia.

Todas as colônias *rfb*_{O113}-positivas isoladas foram submetidas ao mesmo procedimento de semeadura em CLED e posterior estocagem.

4.5 Pesquisa de Fatores de Virulência a partir de Ensaio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

4.5.1 Obtenção do DNA molde de isolamentos *rfb*_{O113}-positivos

Os isolamentos em estoque foram inoculados em 2mL de TSB e incubados a 37°C por 4-6 horas sob agitação. Foram semeados tubos de vidro com TSA e novamente incubados sob as mesmas condições. Um pequeno raspado do crescimento foi ressuspenso em 200µL de PBS, sendo aquecido por 10 minutos a 100°C e sofrendo rápida centrifugação. O DNA extraído dos isolamentos foi utilizado na pesquisa de fatores de virulência através da PCR, sendo que o tempo entre as extrações e a sua utilização não foi superior a 15 dias.

4.5.2 Ensaio de PCR

Ensaio de PCR foram realizados para amplificação dos genes cromossômicos: *stx1*, *stx2*, genes *stx2*, *stx2c*, *stx2d* e *stx2f* das variantes do tipo II da toxina Shiga, *rfb*_{O113}, *iha*, *irp2*, *escC*, *escJ*, *astA*, *cdt-VB*, *lpfA*_{O113} e *efa1 5'* e dos

genes plasmidiais *saa*, *espP*, *subA*, *pilS*, *toxB*, *ehxA* e *etpD* utilizando como DNA molde extração proveniente de cada isolamento. As amplificações foram executadas em dois termocicladores modelo PTC 100 (MJResearch, Watertown, MA, EUA) e modelo TC050A (Labnet Inetrnation, Edison, NJ, EUA). Os iniciadores e os protocolos para as reações de PCR utilizados são apresentados na Tabela 01.

As seguintes amostras de *E.coli* foram utilizadas como controles positivos: E40705 (*stx1*, *iha*, *espP*); E30138 (*stx2*); E32 511 (variantes *stx2* e *stx2c*); E93 016 (variante *stx2d*); EC784 (*saa*, *rfb*_{O113}, *lpfA*_{O113}, *pilS*, *subA*); EDL933 (*escC*, *escJ*, *toxB*, *ehxA*, *etpD* e *efa1 5*); e EAEC 042 (*astA*). A amostra DH5 α foi utilizada como controle negativo em todas as reações. Não havia controle positivo disponível no laboratório para as reações dos genes *cdt-VB*, *irp2* e *stx2f*. As amostras só foram consideradas positivas ou negativas para tais genes após três repetições com extrações de DNA realizadas em distintos períodos seguindo o protocolo de referência para desenho dos iniciadores.

Os reagentes utilizados nas reações de amplificação foram adquiridos do fabricante Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) e suas concentrações utilizadas de acordo com as referências específicas para cada par de iniciadores (Tabela 02).

4.5.3 Eletroforese em gel de agarose

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE; Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). A corrida eletroforética foi feita no mesmo tampão e a voltagem

utilizada foi de 100V mantendo-se a amperagem em torno de 100mA, por 50 minutos, utilizando fonte modelo EPS250 (CBS, Scientific Company, DeIMar, CA, EUA) e cuba modelo MGU-502T (CBS, Scientific Company, DeIMar, CA, EUA) . Nos “slots” do gel foram aplicados os controles, os amplicons e o marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder; Invitrogen), sendo este adequado para mapear fragmentos de DNA fita dupla de 100 pb a 12 kb. Concluída a corrida eletroforética, o gel foi retirado da cuba e corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV modelo TCX 26.M (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

4.6 Sorotipagem

Todos os isolados foram submetidos à sorotipagem para identificação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H). Foi utilizada metodologia de soroaglutinação em tubos recomendada por EWING (1986).

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra. Kinue Irino e sua equipe no laboratório de Enterobactérias do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

4.7 Teste de fermentação do Sorbitol

Os isolados em estoque à -20°C foram reativados em TSB e incubados por 18-24 horas a 37°C. O crescimento obtido foi semeado por esgotamento em Agar

MacConkey Sorbitol (Britânia, Buenos Aires, Argentina) e incubado por 24 horas a 37°C para detecção de amostras fermentadoras deste carboidrato.

4.8 Produção de enterohemolisina

A partir do estoque a -20°C, os isolados foram inoculados em TSB e incubados por 6 horas a 37°C. Após esse período, uma alíquota de 5µL do crescimento foi inoculada, em forma de SPOT, em placas de meio base para agar sangue (HiMedia, Mumbai, Índia), acrescido de CaCl₂ a 10 mM e 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado três vezes em PBS estéril. As placas foram incubadas a 37°C. A primeira leitura do teste foi feita entre 3 e 4 horas depois da inoculação, enquanto a segunda leitura, após 18 horas de incubação para a detecção da produção de α-hemolisina e enterohemolisina, respectivamente (BEUTIN, 1991).

Nos testes, foram incluídas também, para cada placa utilizada, as amostras controle *E. coli* K12 DH5α (não hemolítica), *E. coli* U4-41 (α-hemolítica) e *E. coli* C3888 (enterohemolítica).

4.9 Ensaio de Citotoxicidade

As amostras foram inoculadas em TSB e incubadas por 18 horas a 37°C. O crescimento obtido foi filtrado utilizando membranas MF-Millipore com poros de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Os filtrados estéreis do cultivo foram submetidos a ensaios de citotoxicidade em células Vero (ATCC CCL 81) cultivadas em poços de microplacas de 96 orifícios, contendo 200 µL de meio mínimo de Eagle suplementados com 5% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂.

As amostras de *E. coli* K12 DH5α e EDL933 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente, e a presença de Stx foi verificada pela morte celular e o desprendimento das células do suporte.

4.10 Extração Plasmidial

Os isolados foram submetidos à extração plasmidial através do método descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001). As amostras foram cultivadas em 2 mL de TSB em tubos 16x100 por 18-24 horas a 37°C sob agitação constante de 150rpm. Uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para um microtubo e centrifugada, a 4°C, por 30 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado, de forma a não

deixar resíduos de meio no microtubo e o “pellet” ressuspenso em 100 μ L de solução I (Glicose 50 mM; Tris-HCl [pH 8,0] 25 mM; NaEDTA [pH 8,0] 10 mM) gelada (mantida em gelo) e homogeneizado em vortex. Depois de completa dispersão do “pellet”, 200 μ L de solução II (NaOH 0,2N; SDS 1% [p/v]), recém preparada, foram adicionados. Os microtubos foram agitados cinco vezes por inversão rápida e mantidos em gelo por 10 minutos. Após este tempo, 150 μ L da solução III (Acetato de Sódio 3M pH 4,8) gelada, foram adicionados e os tubos, novamente, agitados 5 vezes por inversão rápida, mantendo-os no gelo por 5 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Uma alíquota de 450 μ L do sobrenadante límpido foi transferida para novo microtubo com 900 μ L de etanol absoluto (temperatura ambiente) e levada ao vortex, sendo deixada em repouso por dois minutos. Centrifugou-se os microtubos a 14.000 rpm por cinco minutos e todo o sobrenadante foi removido. Um mililitro de álcool 70° GL foi adicionado ao “pellet” e a suspensão foi homogeneizada por inversão rápida cinco vezes. Posteriormente, os microtubos foram submetidos à nova centrifugação a 14.000 rpm por dois minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e os microtubos, deixados abertos em temperatura ambiente, por 5-10 minutos, para evaporação do álcool. Para dissolver o DNA, foram adicionados 50 μ L de tampão TE (Tris 10mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) e os microtubos, levados ao vortex em baixa rotação para uma suave homogeneização. O material extraído foi conservado a -20°C.

As amostras controles R23 (não carreadora de plasmídios) e R861 (plasmídios de 4,3; 22; 39 e 91 MDa) foram submetidas à extração junto com os isolados.

Para corrida de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 0,8% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA; pH 8,2), uma alíquota de 15 μ L da solução de DNA foi misturada a 5 μ L de corante Azul de Bromofenol e homogeneizada. Nos poços do gel, foram adicionados 15 μ L da mistura e a corrida foi realizada a 80V, fonte modelo EPS250 (CBS, Scientific Company, DelMar, CA, EUA) e cuba modelo MGU-502T (CBS, Scientific Company, DelMar, CA, EUA), até o corante atingir a parte inferior do gel, que, posteriormente, foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador U.V.

4.11 Análise da estrutura clonal dos isolados

4.11.1 Amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD)

A técnica foi empregada para determinar a relação clonal entre as amostras de *E. coli* *rfb*_{O113} isoladas de bovinos sadios de três rebanhos distintos. Além de analisados no conjunto total, os perfis de bandas gerados a partir de amplificações randômicas também foram analisados em grupos separados por rebanho (01 e 03).

4.11.1.1 Obtenção de DNA

Cada isolamento foi semeado em 2 mL de TSB distribuído em tubos 18x180 mm, mantidos inclinados e sob agitação constante (120 rpm) por 18 horas a 37°C.

Após o período de incubação, a densidade óptica (DO) a 600 nm de uma diluição 1:10 em água, de uma alíquota da cultura, foi determinada em espectrofotômetro modelo QI1080 (Quimis®, Diadema, SP, Brasil). Para uma DO de 0,4, foi utilizada uma alíquota de 200 µL do crescimento original, suspensa em 900 µL de PBS estéril (PACHECO *et al*, 1997). A suspensão foi então fervida por 10 minutos a 100°C, centrifugada brevemente e utilizada como fonte de DNA para as reações de amplificação.

4.11.1.2 Reação de Amplificação

Todas as reações foram executadas em um mesmo termociclador PTC-100 (MJ Research). As cepas foram comparadas utilizando-se 0,4 µL dos iniciadores 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3') e 1252 (5'-GTGGATGCGA-3') (30 pmol/µL), 3 µL de tampão PCR 10 X, 1,8µl MgCl₂ (1,5 mM), 3,0 µl de dNTP (2,5 mM), 3,0 µl de Taq-polimerase (1,5 U) e 3,0 µL do DNA molde, no volume final de 30 µL (PACHECO *et al*, 1997).

Foram utilizados os seguintes parâmetros para o programa de amplificação: 4 ciclos de 94°C (5 min.), 37°C (5 min.) e 72°C (5 min.), seguidos de 30 ciclos de 94°C (1 min.), 37°C (1 min.) e 72°C (2 min.) e uma etapa final de extensão de 72°C (10 min.) (PACHECO *et al*, 1997).

4.11.1.3 Eletroforese em gel de agarose

Os “amplicons” foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA; pH 8,2), em fonte modelo EPS250 (CBS, Scientific Company, DelMar, CA, EUA) e cuba modelo MGU-502T (CBS, Scientific Company, DelMar, CA, EUA), com voltagem de 80 V e amperagem de 80 mA por quatro horas. Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (5 mg/mL) e visualizado em transiluminador UV modelo TCX 26.M (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França). No gel, além das amostras, foi aplicado o marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4.11.1.4 Interpretação e análise de perfis de RAPD

Na caracterização das amostras, considerou-se como de mesmo tipo de RAPD (designados por números algébricos) aquelas que apresentassem índice de similaridade acima de 75% (GRIF *et al*, 1998). Os subtipos, apresentando ao menos uma banda polimórfica, foram designados por letras minúsculas.

Os perfis genéticos dos isolados foram comparados através do programa RAPDistance versão 1.03 (ARMSTRONG *et al*, 1994), utilizando como algoritmo de similaridade o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901). A matriz de distâncias

gerada pelo programa foi utilizada para a construção de um dendrograma, empregando o método de UPGMA (agrupamento pareado por médias aritméticas) com o auxílio do programa MEGA versão 4 (Tamura *et al*,2007).

4.11.2 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A metodologia utilizada foi de acordo com o padrão estabelecido pela rede PulseNet USA para o protocolo de subtipificação molecular de *E. coli* O157:H7, sorotipos de *Salmonella* e *Shigella sonnei* (RIBOT *et al*, 2006).

4.11.2.1 Montagem dos “plugs” de agarose

Uma colônia isolada oriunda de crescimento em meio seletivo e indicador foi semeada em TSA (Britânia, Buenos Aires, Argentina) e, também, em TSB (Britânia, Buenos Aires, Argentina) para possíveis testes futuros com esta mesma colônia testada em PFGE. A placa e o caldo foram incubados por 18-24 horas a 37°C.

Preparou-se agarose (SeaKem Gold, Charles City, IA, EUA) a 1%, mantendo-a em banho-maria a 55°C até a sua utilização. Uma alíquota do crescimento em TSA foi transferida, com auxílio de “swab” estéril, para tubos de 12x100 com 2 mL de tampão de suspensão celular (Tris 100 mM; EDTA 100 mM; pH 8,0). A concentração

de células na suspensão foi ajustada para absorvância igual a 1.0 em um comprimento de onda de 610 nm em espectrofotômetro. O ajuste foi feito a partir da diluição da suspensão que havia no tubo ou do acréscimo de mais crescimento à suspensão. Duzentos microlitros da suspensão ajustada, em temperatura ambiente, foram transferidos para um microtubo com 10 μ L de Proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, 200 μ L de agarose a 1% foram adicionados ao microtubo. Rapidamente, uma alíquota de 200 μ L da mistura foi transferida para o molde dos “plugs”.

4.11.2.2 Processo de lise *in situ*

Após total polimerização da agarose, os “plugs” foram transferidos, com auxílio de uma espátula, para tubos de Falcon 50 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular (Tris 50 mM; EDTA 50 mM [pH 8,0]; Sarcosyl 1%; Proteinase K 20 mg/mL). Os tubos de Falcon foram incubados em banho-maria por 18-24 horas a 54°C sob agitação constante (175 rpm).

Após o período de incubação em banho-maria, os “plugs” foram lavados com água ultrapura quatro vezes e com tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) duas vezes, com intervalos de 15 minutos entre as lavagens, quando os tubos Falcon continuavam em banho-maria a 54°C sob agitação.

A cepa padrão de *Salmonella* ser. Braenderup H9812 (SB) foi utilizada como controle em todas as reações e para todas as enzimas. No caso de digestão das amostras com a enzima *Bln I*, a digestão da cepa SB permaneceu sendo com a enzima *Xba I*.

4.11.2.3 Digestão enzimática do DNA nos “plugs”

Após as lavagens, os “plugs” foram transferidos para criotubos com 2 mL de tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) e armazenados em geladeira a 4°C.

Para a digestão enzimática, foram preparados microtubos com 200 µL da solução com a enzima de restrição (10 U/µL), o tampão da enzima (de acordo com as especificações do fabricante) e água ultrapura. A enzima de restrição *Xba I* (Fermentas International, Ontário, Canadá) foi utilizada em todas as amostras e uma segunda enzima, *Bln I* (Fermentas International, Ontário, Canadá), só foi utilizada em casos onde a primeira não foi capaz de diferenciar as amostras. Os “plugs” das amostras foram cortados em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 mm e transferidos para os microtubos com a solução de digestão e, então, incubados em banho-maria por 4 horas a 37°C.

4.11.2.4 Montagem do gel de corrida

Após a incubação, a solução de digestão foi aspirada dos microtubos, com auxílio de micropipeta, e os “plugs” foram colocados sobre cada um dos pentes de corrida, sendo as cepas SB colocadas nos poços 1, 6, 11 e 15. Posicionou-se o pente sobre a base própria do aparelho CHEF DR III (BioRad Inc., Hercules, CA, EUA) e, com a espátula, pressionou-se um pouco os “plugs” sobre a base do gel para que se fixassem melhor. Foram acrescentados 100 mL de agarose a 1% e, após total polimerização do gel, o pente foi retirado.

4.11.2.5 Condições de corrida

O gel foi retirado da base e suas arestas limpas, tirando o excesso de agarose. Foi, então, transferido para o aparelho que já continha tampão TBE 1X, refrigerado a 14°C. A corrida foi realizada em sistema de eletroforese com resfriamento CHEF DR III (BioRad Inc. Hercules, CA, EUA) por 19 horas a 200V (6V/cm), 14°C. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µL/mL) e fotografados sob luz U.V. através do “software” Doc-Lit.

4.11.2.6 Interpretação e análise dos perfis de PFGE

As fotos dos géis com os perfis gerados após a corrida eletroforética foram carregadas no “software” da rede PulseNet – USA, passando por um processo de marcação e identificação de bandas. Depois de todos os perfis gerados serem armazenados e selecionados para análise, um dendrograma foi gerado utilizando o critério de TENOVER *et al* (1995), onde cepas indistinguíveis têm o mesmo padrão; altamente relacionadas, até 3 fragmentos distintos; possivelmente relacionadas, de 4 a 6 fragmentos distintos; e não relacionadas, mais de 6 fragmentos distintos. Os padrões identificados foram determinados por numerais romanos distintos. Utilizou-se como algoritmo de similaridade o coeficiente de Dice.

Tabela 02 – Iniciadores e condições adotadas nas reações de PCR utilizadas neste estudo.

genes	Iniciadores	Produto (pb)	Condições da PCR ^a						Referências
			D ^b		A		E ^c		
			T ^o C	t(s)	T ^o C	T(s)	T ^o C	t(s)	
<i>saa</i>	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC ATG GAC ATG CCT GTC GCA AC	119	95	60	54	60	72	60	PATON & PATON, 2002 (modificado pelo grupo)
<i>espP</i>	AAG CAG CAG GCA CTT GAA CG GGA GTC GTC AGT CAG TAG AT	1830	94	30	56	60	72	150	BRUNDER <i>et al</i> , 1999
<i>rfb</i> _{O113}	AGC GTT TCT GAC ATA TGG AGT G GTG TTA GTA TCA AAA GAG GCT CC	593	95	60	60	60	72	60	PATTON & PATTON, 1998 (modificado pelo grupo)
<i>stx1</i>	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G TTG CCC CCA GAG TGG ATG	388	94 ^(f) 94 ^(d)	60	48 50	60	72 72	60 60	CHINA, PIRSON & MAINIL, 1996 (modificado pelo grupo)
<i>stx2</i>	TGG GTT TTT CTT CGG TAT C GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT	807	94 ^(f) 94 ^(d)	60	48 50	60	72 72	60 60	CHINA, PIRSON & MAINIL, 1996 (modificado pelo grupo)
<i>stx2c</i>	GCG GTT TTA TTT GCA TTA GT AGT ACT CTT TTC CGG CCA CT	124	95	30	58	30	72	30	WANG, CLARCK & RODGERS, 2002
<i>stx2</i>	GCG GTT TTA TTT GCA TTA GT TCC CGT CAA CCT TCA CTG TA	115	95	30	58	30	72	30	WANG, CLARCK & RODGERS, 2002
<i>stx2d</i>	GGT AAA ATT GAG TTC TCT AAG TAT CAG CAA ATC CTG AAC CTG ACG	175	95	30	58	30	72	30	WANG, CLARCK & RODGERS, 2002
<i>stx2f</i>	TGT CTT CAG CAT CTT ATG CAG CAT GAT TAA TTA CTG AAA CAG AAA C	150	95	30	58	30	72	30	WANG, CLARCK & RODGERS, 2002
<i>efa1 5'</i>	TGG GCA GAA CAT TTT CAC CAG TTC CTT TCA GGT GGG GAA CCA TAT GGC	725	94	30	58	30	72	30	MORABITO <i>et al</i> , 2003

(a) 30 ciclos; (b) uma etapa de desnaturação por 5 minutos; (c) uma etapa final de extensão por 5 minutos;

(d) 10 ciclos; (e) 15 ciclos; (f) 20 ciclos; (g) 25 ciclos; (h) 35 ciclos;

D = desnaturação; A = anelamento; E = extensão

Tabela 02 (continuação) – Iniciadores e condições adotadas nas reações de PCR utilizadas neste estudo.

genes	Iniciadores	Produto (pb)	Condições da PCR ^a						Referências
			D ^b		A		E ^c		
			T ^o C	t(s)	T ^o C	T(s)	T ^o C	t(s)	
<i>lpfA</i> _{O113}	ATG AAG CGT AAT ATT ATA G TTATTT CTT ATA TTC GAC	573	94	60	52	50	72	60	DOUGHTY <i>et al</i> , 2002.
<i>escC</i>	GTC AGC GAC AGA TAT AAC ATA C AAC GCA TTC ACC CTA ATC	449	93	60	54	40	72	60	KYAW <i>et al</i> , 2003
<i>escJ</i>	CCA AAG AAA TGG ACA AAA GTG G GAC CGA TGG TGC TAA GTT AAC C	337	93	60	54	40	72	60	KYAW <i>et al</i> , 2003
<i>irp2</i>	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT	280	94	60	60	60	72	60	KARCH <i>et al</i> , 1999
<i>ehxA</i>	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC AAT GAC CCA AGC TGG TTA AGC	534	95 ^(d)	60	65	120	72	90	PATON & PATON, 1998
			95 ^(e)	60	60	120	72	90	
			95 ^(d)	60	60	120	72	150	
<i>astA</i>	CCA TCA ACA CAG TAT AT GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT	111	95	30	55	120	72	120	YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996.
<i>cdt-VB</i>	AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA AGC CTC TTT TAT CGT CTG GA	1363	94	30	52	60	72	60	BIELASZEWSKA <i>et al</i> , 2004
<i>etpD</i>	CGT CAG GAG GAT GTT CAG CGA CTG CAC CTG TTC CTG ATT A	1062	94	30	52	60	72	70	SCHMIDT, HENKEL & KARCH, 1997
<i>pilS</i>	TGA ACT TCA GAG CAC GTC TGT C TCG CTA CTG CAG ACG GTA AC	502	94	60	55	60	72	60	DR. ALEXANDRE BELO – DMIP – UERJ (dado não publicado)
<i>toxB</i>	ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C	602	94	60	58	60	72	120	TATARCZAK <i>et al</i> 2005

(a) 30 ciclos; (b) uma etapa de desnaturação por 5 minutos; (c) uma etapa final de extensão por 5 minutos;

(d) 10 ciclos; (e) 15 ciclos; (f) 20 ciclos; (g) 25 ciclos; (h) 35 ciclos;

D = desnaturação; A = anelamento; E – extensão

Tabela 02 (continuação) – Iniciadores e condições adotadas nas reações de PCR utilizadas neste estudo.

genes	Iniciadores	Produto (pb)	Condições da PCR ^a						Referências
			D ^b		A		E ^c		
			T ^o C	t(s)	T ^o C	T(s)	T ^o C	t(s)	
<i>iha</i>	CTG GCG GAG GCT CTG AGA TCA TCC TTA AGC TCC CGC GGC TGA		94	30	56	60	72	90	JOHNSON <i>et al</i> , 2005.
<i>subA</i>	TAT GGC TTC CCT CAT TGC C TAT AGC TGT TGC TTC TGA CG	556	95	60	55	60	72	60	PATON & PATON, 2005 (modificado pelo grupo)

(a) 30 ciclos; (b) uma etapa de desnaturação por 5 minutos; (c) uma etapa final de extensão por 5 minutos;

(d) 10 ciclos; (e) 15 ciclos; (f) 20 ciclos; (g) 25 ciclos; (h) 35 ciclos;

D = desnaturação; A = anelamento; E – extensão

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento de colônias *rfb*_{O113}-positivas

Além dos sete isolados já previamente selecionados, buscou-se a recuperação de novas colônias oriundas de 105 suspensões polimicrobianas positivas para o gene *rfb*_{O113} detectadas nas coletas realizadas entre 2002 e 2003. Após testes dos “pools”, de até 400 colônias provenientes de 28 suspensões que apresentaram resultado positivo em novo ensaio, foi possível recuperar 13 colônias *rfb*_{O113}. Tais isolamentos foram obtidos de 7 suspensões distintas, oriundas de 6 animais diferentes.

Das 20 suspensões obtidas na coleta de 2008, 20% (n=4) foram positivas para o gene *rfb*_{O113}. Metade destas foi oriunda de bezerros que não participaram do outro período de coleta. As demais amostras positivas pertenciam a animais selecionados em 2002/2003 que, porém, não foram positivos à época. No entanto, das quatro suspensões positivas, apenas nove colônias, de uma única amostra, foram recuperadas.

5.2 Caracterização genotípica

Todos os isolados foram positivos para os genes *rfb*_{O113} e *lpf*_{O113}. Apenas quatro cepas (13,8%) não apresentavam nenhum gene que codifica Stx. Vinte e cinco amostras (86,2%) foram positivas para o gene *stx2*, sendo seis destas também positivas para *stx1*. Nenhuma amostra foi positiva apenas para este gene. A variante Stx2 foi a mais freqüente dentre as amostras (n=21; 72,4%), enquanto o gene *stx2c* foi encontrado em 11 isolados. Os genes *stx2d* e *stx2f* não foram detectados.

Os genes plasmidiais mais comuns foram *ehxA*, presente em 75, 8% (n=22) das amostras, e *subA*, que amplificou em 72,4% (n=21) dos isolados. Os genes *espP*, *pilS* e *saa* estavam presentes em 65,5% das cepas.

O gene *iha* foi positivo para 82,7% (n=24) das amostras, enquanto *astA* foi o menos comum, amplificando em apenas sete isolados. Nenhuma cepa foi positiva para os genes *efa1 5'*, *cdt-VB*, *irp2*, *etpD*, *escC*, *escJ* e *toxB*. A Tabela 03 apresenta os dados acumulados dos isolamentos.

Analisando os genes em conjunto, foram observados oito perfis genotípicos distintos, dentre os quais o Perfil IV (*stx2* / variante *stx2* / *espP* / *pilS* / *saa* / *subA* / *iha* / *ehxA* / *lpf*_{O113}) foi o mais freqüente, sendo apresentado por 12 amostras (Tabela 04 e Figura 01). Apenas três perfis (cinco amostras) apresentavam três ou menos fatores, sendo que o perfil VIII (duas amostras) foi positivo apenas para um gene de virulência. O restante era composto por, pelo menos, seis destes fatores, e dois perfis demonstraram a ocorrência simultânea de 10 genes de virulência. Vinte e

quatro isolados (82, 75%) carregam ao menos seis genes de virulência (Figuras 02 e 04, Tabela 04).

Analisando a distribuição dos perfis de virulência por rebanho, pode-se observar que tanto o rebanho 01 quanto o 03 demonstraram a ocorrência de genótipos potencialmente patogênicos para humanos. Apenas o rebanho 02 apresentou um genótipo menos virulento (apenas *astA* e *lpf*_{O113}).

No rebanho 01, foram detectados, na sua maioria, perfis com ao menos seis genes relacionados à virulência, sendo todos eles associados anteriormente a casos de doenças em humanos e apenas um perfil com amplificação simultânea de três genes (Figura 03).

Já no terceiro rebanho, observou-se a maior frequência de um perfil potencialmente virulento para humanos; porém, também foi detectado um perfil pouco patogênico, com apenas a ocorrência de um gene (*lpf*_{O113}) (Figura 03).

Tabela 03 – Perfis genéticos de amostras de *E. coli* *rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

Amostra	Coleta	Faixa Etária	Rebanho	Padrão genotípico												Perfil Genético
				Genes cromossômicos							Genes plasmidiais					
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i> variantes	<i>rfb</i> _{O113}	<i>iha</i>	<i>astA</i>	<i>lpfA</i> _{O113}	<i>espP</i>	<i>piIS</i>	<i>saa</i>	<i>subAB</i>	<i>ehxA</i>	
M01	out/02	B	1	-	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	I	
M02	out/02	B	1	-	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	I	
M03	jun/03	B	1	-	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	I	
M04	ago/03	B	1	-	+	NT	+	-	-	+	-	-	-	+	VI	
M05	mai/03	B	1	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
M06	mai/03	B	1	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
M07	mai/03	B	1	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
M08	mai/03	B	1	-	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	I	
M09	jun/03	B	1	-	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	I	
M10	jul/03	B	1	-	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	I	
M11	nov/02	A	1	+	+	<i>stx2c</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	V	
M12	nov/02	A	1	+	+	<i>stx2c</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	V	
M13	nov/02	A	1	+	+	<i>stx2c</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	V	
T01	mar/02	N	2	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	VII	
T02	abr/02	N	2	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	VII	
B01	set/02	A	3	+	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	II	
B02	nov/02	A	3	+	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	III	
B03	dez/02	A	3	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	VIII	
B04	dez/02	A	3	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	VIII	
B05	out/02	A	3	+	+	<i>stx2</i> / <i>stx2c</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	III	
B06	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B07	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B08	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B09	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B10	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B11	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B12	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B13	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	
B14	mar/08	A	3	-	+	<i>stx2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	IV	

(B) – bezerro ; (N) – novilho ; (A) – adulto ; (NT) – não tipável

Tabela 04 – Perfis genéticos de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

Perfil Genético	Nº de genes	Genes detectados	Nº de amostras
I	10	<i>stx2 / variante stx2 / stx2c / espP / pilS / saa / subA / iha / ehxA / lpf</i> _{O113}	6
II	10	<i>stx1 / stx2 / variante stx2 / espP / pilS / saa / subA / iha / ehxA / lpf</i> _{O113}	1
III	9	<i>stx1 / stx2 / variante stx2 / stx2c / subA / iha / astA / ehxA / lpf</i> _{O113}	2
IV	9	<i>stx2 / variante stx2 / espP / pilS / saa / subA / iha / ehxA / lpf</i> _{O113}	12
V	6	<i>stx1 / stx2 / stx2c / iha / astA / lpf</i> _{O113}	3
VI	3	<i>stx2 / ehxA / lpf</i> _{O113}	1
VII	2	<i>astA / lpf</i> _{O113}	2
VIII	1	<i>lpf</i> _{O113}	2

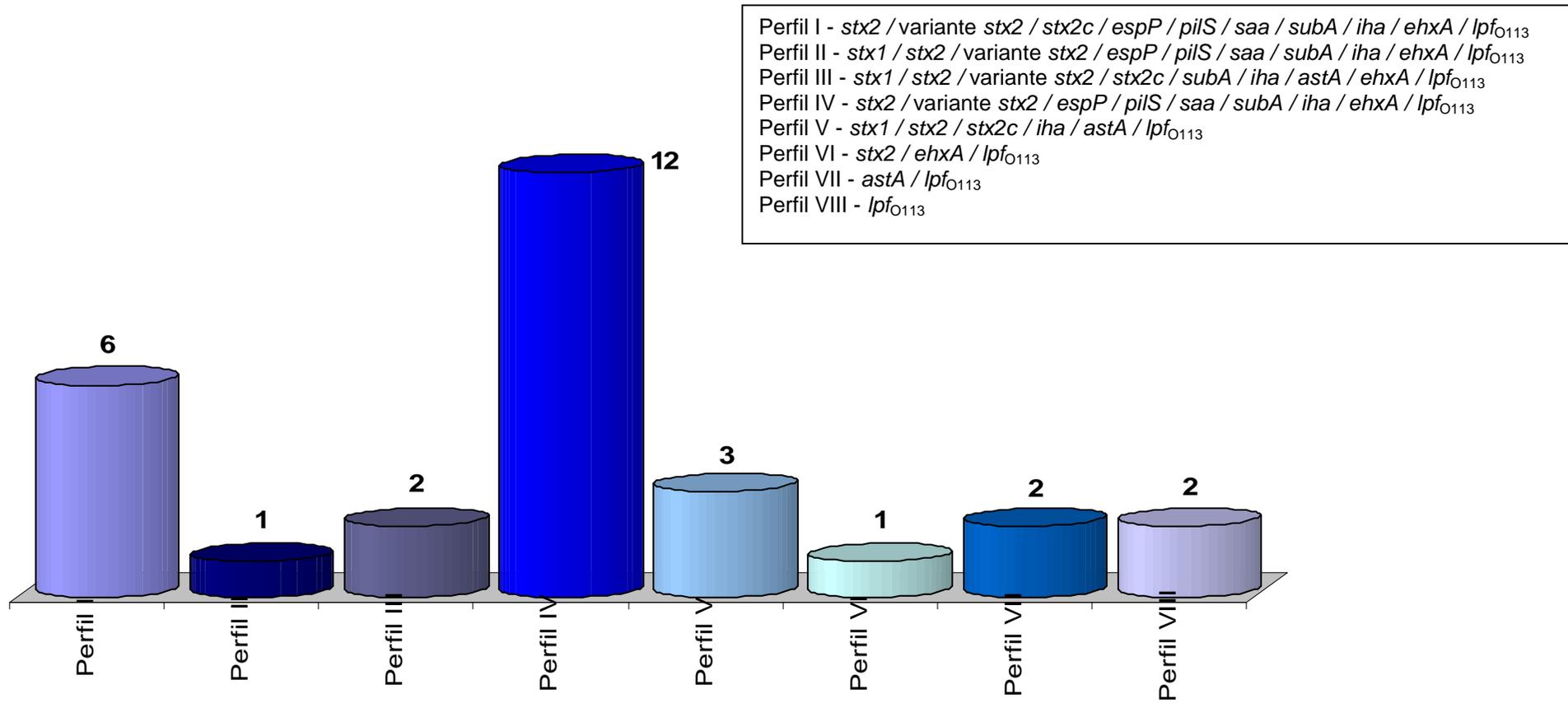


Figura 01 – Distribuição de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos saudáveis em Miracema, RJ, dentre os oito perfis genéticos observados.

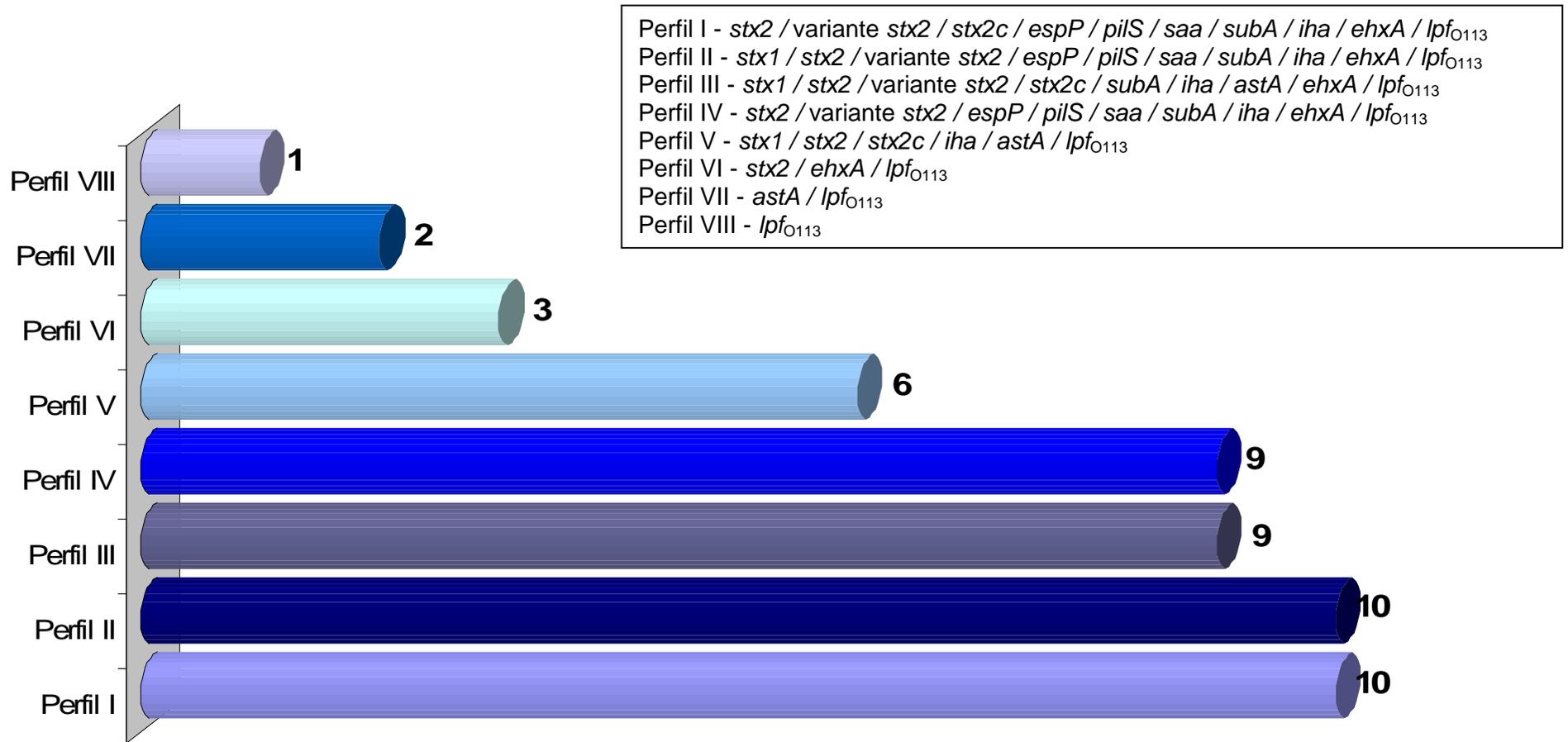


Figura 02 – Ocorrência simultânea de genes de virulência em amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos pertencentes a oito perfis genéticos distintos.

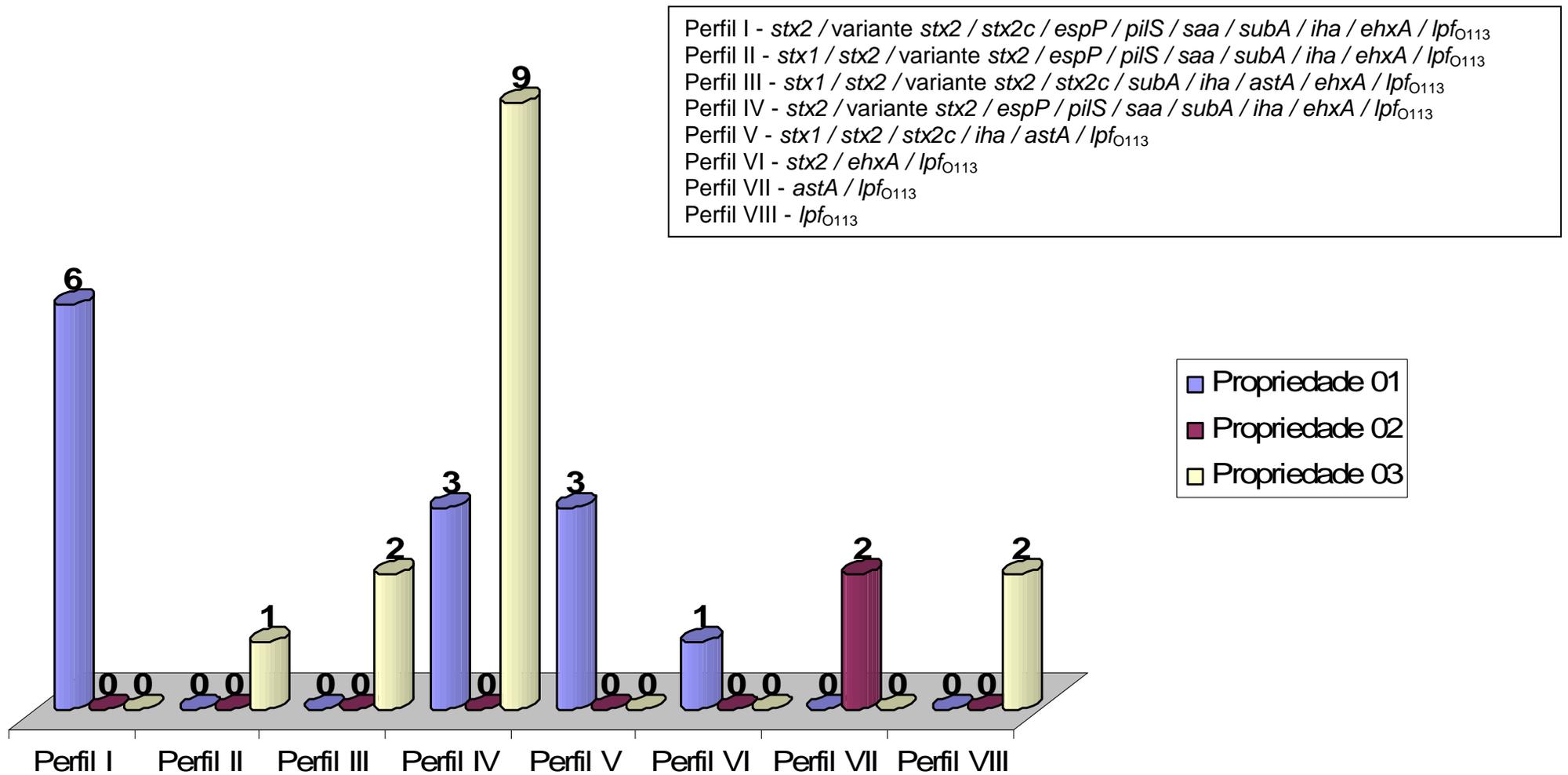


Figura 03 – Distribuição dos perfis de virulência detectados entre as amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ, em cada rebanho.

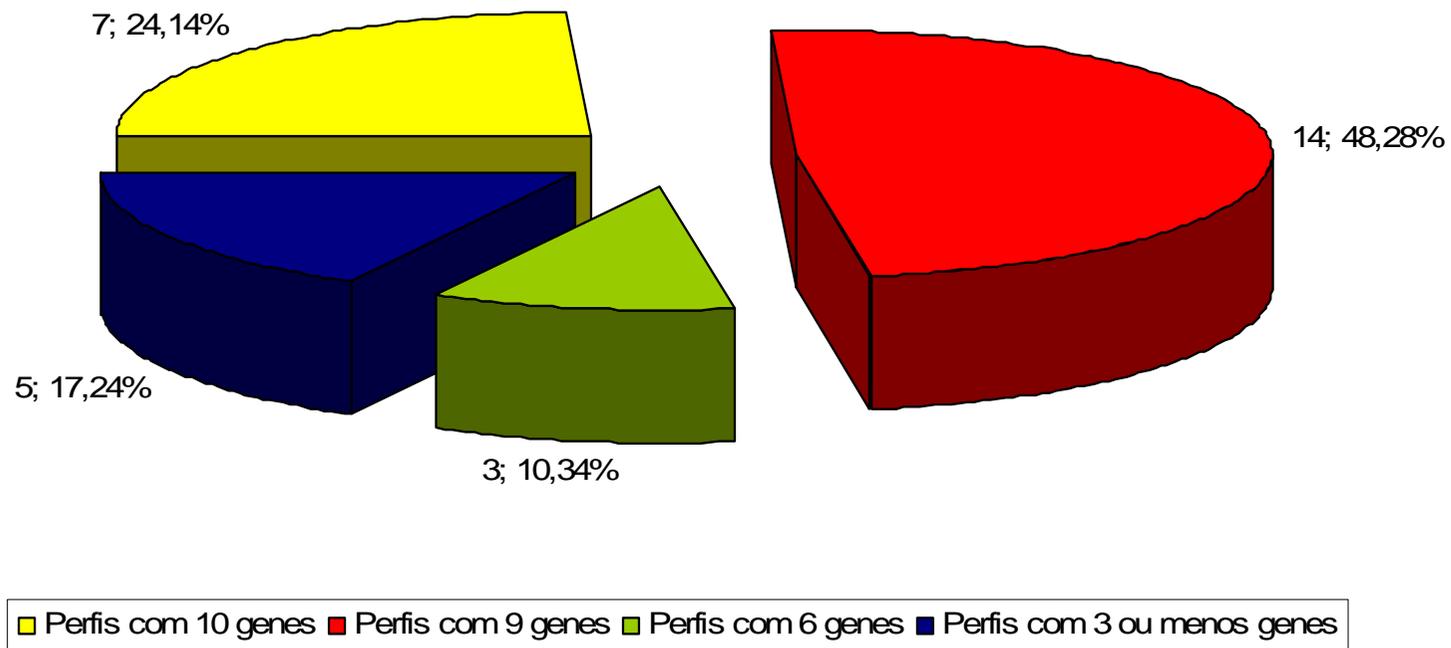


Figura 04 – Frequência de perfis genéticos, observados em amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos saudáveis, com ocorrência simultânea de múltiplos genes de virulência.

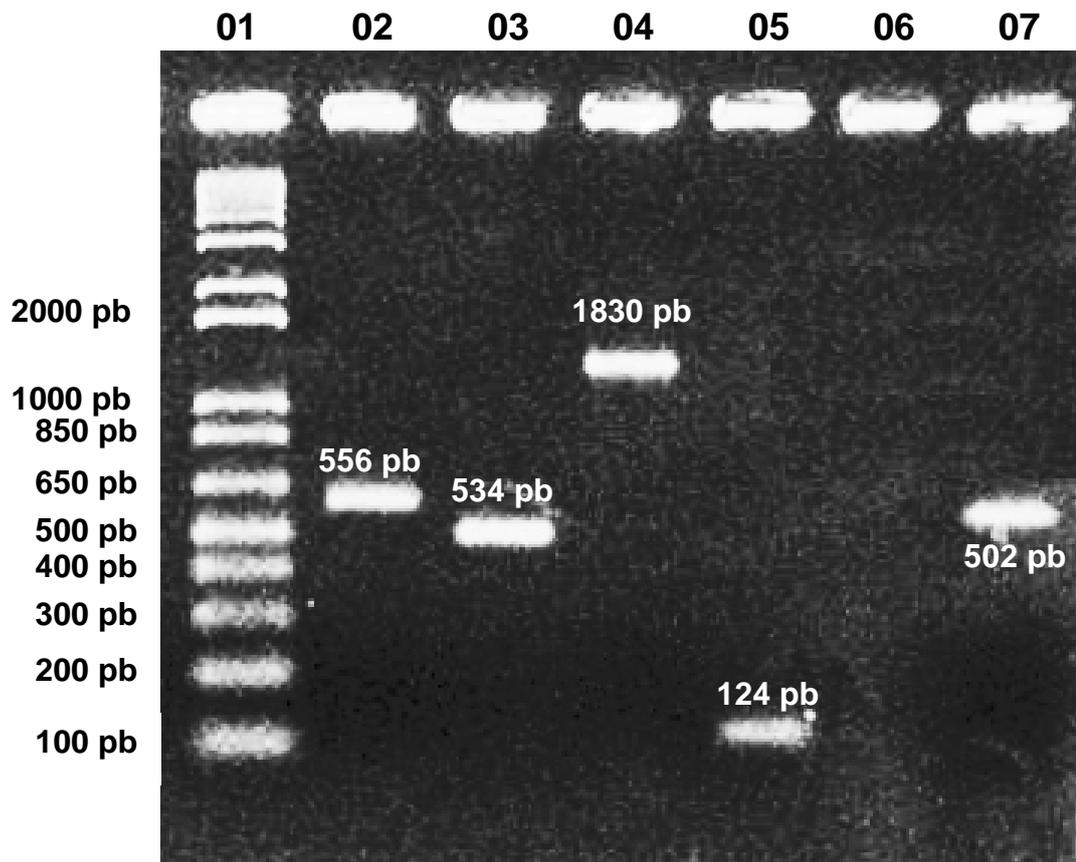


Figura 05 – Foto representativa de gel de agarose a 1% de ampliações positivas para alguns genes.

01 – kb plus; 02 – gene *subA*; 03 – gene *pilS*; 04 – gene *espP*; 05 – gene *saa*; 06 – DH5 α (controle negativo para todas as reações); 07 – gene *ehxA*.

5.3 Testes fenotípicos

5.3.1 Sorotipagem das amostras *rfb*_{O113}-positivas isoladas

Com exceção de duas amostras que apresentaram colônias rugosas, não sendo possível determinar seu antígeno O, todas as outras pertenciam ao sorogrupo O113. As cepas rugosas apresentaram antígeno flagelar H2 e H7. Dentre os outros isolados, 26 eram O113:H21 e apenas uma amostra deste sorogrupo apresentou antígeno flagelar H7 (Tabela 05).

5.3.2 Fermentação de sorbitol

Apesar de haver cinco amostras que apresentaram fenótipo negativo para este teste, a maioria das amostras (n=24; 82,7%) fermentaram este carboidrato quando semeadas em Agar MacConkey Sorbitol (Tabela 05).

5.3.3 Produção de enterohemolisina

Os testes demonstraram que 19 das 29 (65,5%) amostras, todas positivas para o gene *ehxA*, eram produtoras de enterohemolisina (Ehly). Entretanto, mesmo após repetição dos ensaios, três isolados não expressaram este fenótipo, apesar de serem *ehxA*-positivos. Não foi detectada a presença de α -hemolisina entre os isolados (Tabela 05).

5.3.4 Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade realizados em células Vero demonstraram a expressão de Stx em todos os isolados STEC. Dentre as amostras que não possuíam os genes responsáveis pela produção desta toxina (n=4; 13,8%), não foram observados efeitos citotóxicos (Tabela 05).

5.4 Presença de plasmídios de alto e baixo peso molecular

Vinte isolados apresentaram um plasmídio de alto peso molecular. Não foi observada a ocorrência de mais de um plasmídio de alto peso, entretanto, em todas estas amostras havia a presença de ao menos um, podendo ser observados também

dois ou três, plasmídios de baixo peso molecular. Nove amostras (31%) não demonstraram a presença de plasmídios de alto peso molecular e, dentre estas, apenas três (10,3%) não apresentaram nenhum plasmídio (Tabela 06 e Figuras 06 e 07).

Tabela 05 – Caracterização fenotípica de amostras de *E. coli* rfb_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

Amostra	Coleta	Faixa Etária	Rebanho	Padrão Fenotípico			
				Ehly	MC Sorbitol	sorologia	Stx-Vero
M01	out/02	B	1	+	+	O113:H21	+
M02	out/02	B	1	+	+	O113:H21	+
M03	jun/03	B	1	+	+	O113:H21	+
M04	ago/03	B	1	-	+	O113:H21	+
M05	mai/03	B	1	+	+	O113:H21	+
M06	mai/03	B	1	+	+	O113:H21	+
M07	mai/03	B	1	+	+	O113:H21	+
M08	mai/03	B	1	+	+	OR:H7	+
M09	jun/03	B	1	+	+	O113:H21	+
M10	jul/03	B	1	+	+	O113:H21	+
M11	nov/02	A	1	-	-	O113:H21	+
M12	nov/02	A	1	-	-	O113:H21	+
M13	nov/02	A	1	-	-	O113:H21	+
T01	mar/02	N	2	-	+	O113:H21	-
T02	abr/02	N	2	-	+	O113:H21	-
B01	set/02	A	3	+	+	O113:H21	+
B02	nov/02	A	3	-	-	O113:H21	+
B03	dez/02	A	3	-	+	O113:H7	-
B04	dez/02	A	3	-	+	OR:H2	-
B05	out/02	A	3	-	-	O113:H21	+
B06	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B07	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B08	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B09	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B10	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B11	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B12	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B13	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+
B14	mar/08	A	3	+	+	O113:H21	+

(B) – bezerro ; (N) – novilho ; (A) – adulto

Tabela 06 – Ocorrência de plasmídios de alto e baixo peso molecular em amostras de *E. coli* *rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

Amostra	Plasmídios		Marcadores plasmídias
	Alto Peso	Baixo Peso	
M01	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M02	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M03	1	2	<i>espP / ehxA / pilS / saa</i>
M04	0	0	<i>ehxA</i>
M05	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M06	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M07	1	3	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M08	0	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M09	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M10	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
M11	0	1	-
M12	0	1	-
M13	0	1	-
T01	0	0	-
T02	0	0	-
B01	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B02	0	2	<i>ehxA</i>
B03	1	1	-
B04	1	1	-
B05	0	1	<i>ehxA</i>
B06	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B07	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B08	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B09	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B10	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B11	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B12	1	3	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B13	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>
B14	1	2	<i>espP / saa / ehxA / pilS</i>

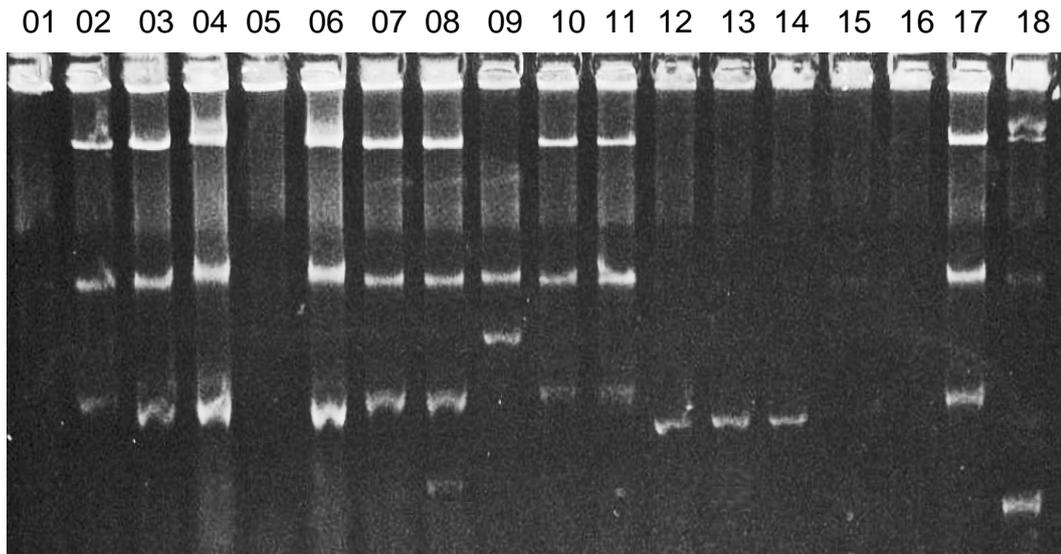


Figura 06 – Foto representativa de gel de agarose a 0,8% da extração plasmidial de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

1 – controle negativo R23; 2 a 17 – amostras M01 a B01 (ordem das tabelas); 18 – controle positivo R861

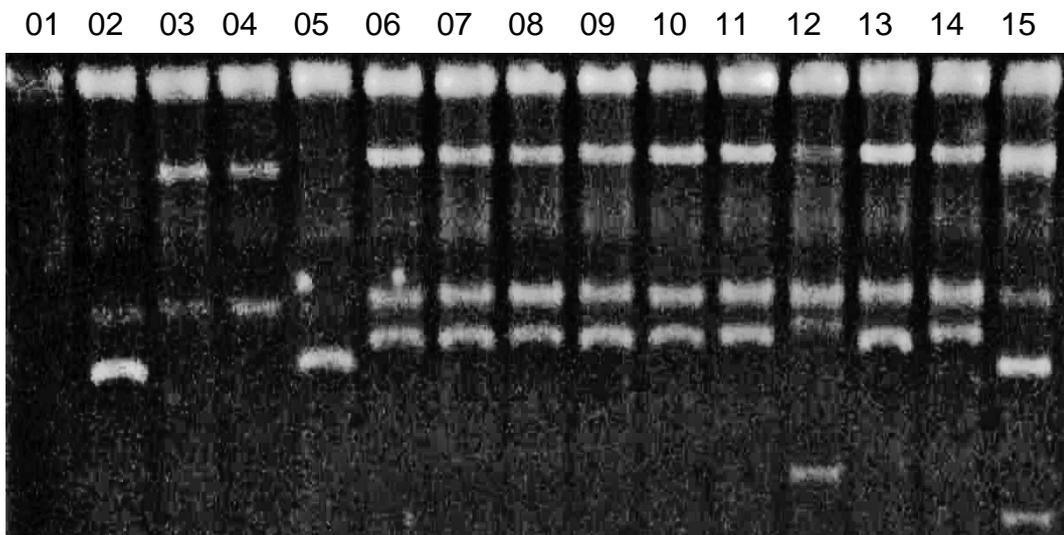


Figura 07 – Foto representativa de gel de agarose a 0,8% da extração plasmidial de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

1 – controle negativo R23; 2 a 14 – amostras B02 a B14 (ordem das tabelas); 15 – controle positivo R861

5.5 Análise da estrutura clonal dos isolados

5.5.1 Perfil genético dos isolados gerados por ensaios de RAPD

Os ensaios de RAPD realizados com o iniciador 1252 geraram um total de 21 bandas, variando de, aproximadamente, 100 pb a 4000 pb. Observou-se a ocorrência de uma banda de aproximadamente 650 pb comum à maioria das amostras, com exceção de três amostras. Com o iniciador 1254, foram geradas 23 bandas entre 100 pb e 2000 pb, sendo duas bandas de, aproximadamente, 1000 pb comuns a todas as amostras.

Após os ensaios de amplificação, observou-se em geral uma maior ocorrência de bandas polimórficas com o uso do iniciador 1252 (Figuras 08 e 09). Optou-se deste modo, para a análise dos dados, a construção de uma matriz binária combinando os resultados obtidos a partir de ambos os iniciadores.

Após a construção do dendrograma foram observados quatro grupos clonais (GC) distintos. No GC I, um subtipo (Ia) apresentou sete amostras idênticas e outras três (Ib, Ic e Id) possuíam índice de similaridade (IS) maior que 90% quando comparadas a Ia. Três outras amostras foram idênticas no primeiro GC (In). O segundo GC apresentou IS de aproximadamente 73% com o primeiro e suas amostras apresentaram IS de 90%. Entre os isolados do GC III, observou-se IS de 75%. A única amostra pertencente ao último GC apresentou IS inferior a 65% com relação às outras amostras (Figura 10).

A análise individual do rebanho 01, quanto aos perfis de banda apresentados pelas amostras, demonstrou que todas elas estavam relacionadas entre si com IS de aproximadamente 80%. Foram identificados onze subtipos do único GC observado. Três amostras foram idênticas (Figura 11).

Quando analisado individualmente, o rebanho 03 apresentou quatro GC distintos. Observou-se que no primeiro GC, formado por 10 amostras, o menor IS foi aproximadamente 80%. O segundo era composto por dois isolados com IS de 90% entre si. Os terceiro e quarto GC eram de apenas uma amostra com IS aproximado de 66% e 63%, respectivamente, quando comparados com o restante dos isolados (Figura 12).

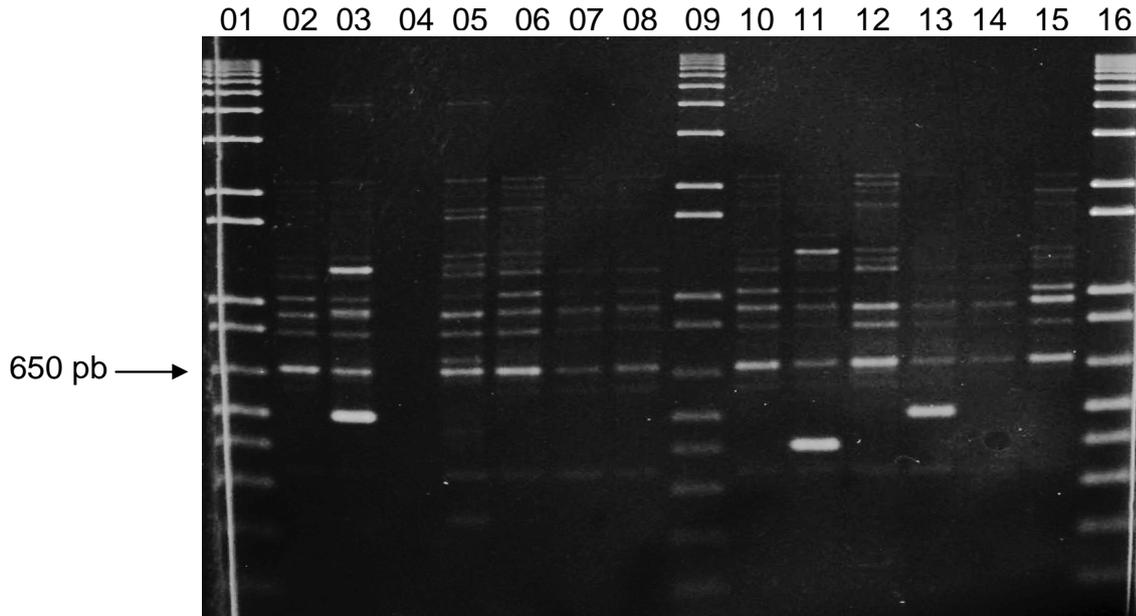


Figura 08 – Foto representativa de gel de agarose com amostras submetidas a ensaios de RAPD com o iniciador 1252.
 01, 09 e 16 – Marcador de peso molecular kb plus;
 02 a 08 e 10 a 15 – amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios

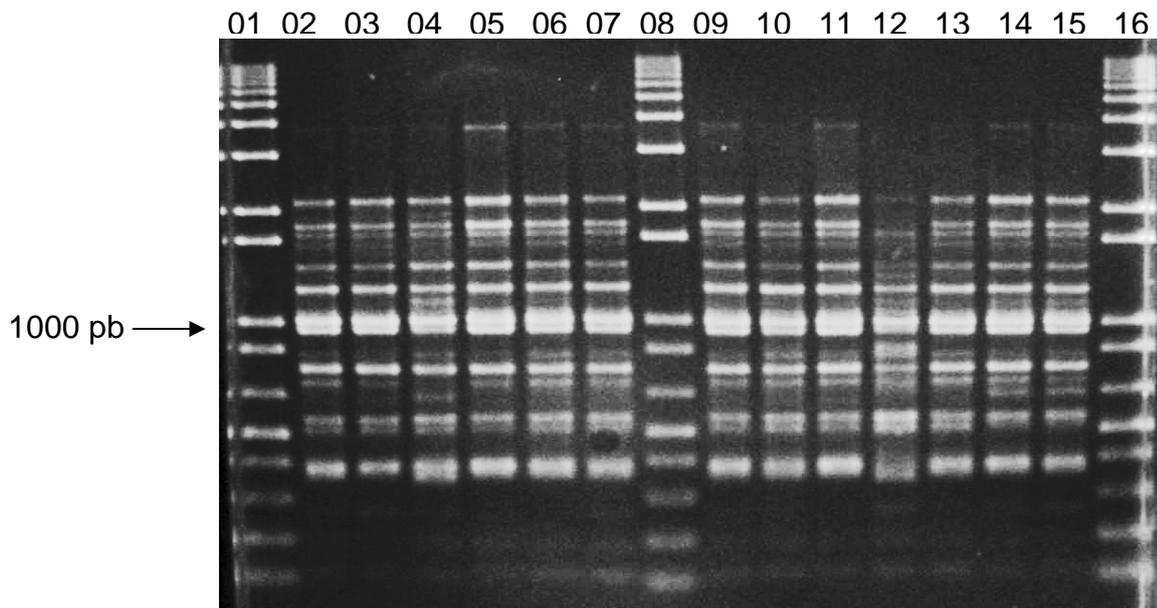


Figura 09 – Foto representativa de gel de agarose com amostras submetidas a ensaios de RAPD com o iniciador 1254.
 01, 08 e 16 – Marcador de peso molecular kb plus;
 02 a 07 e 09 a 15 – amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios

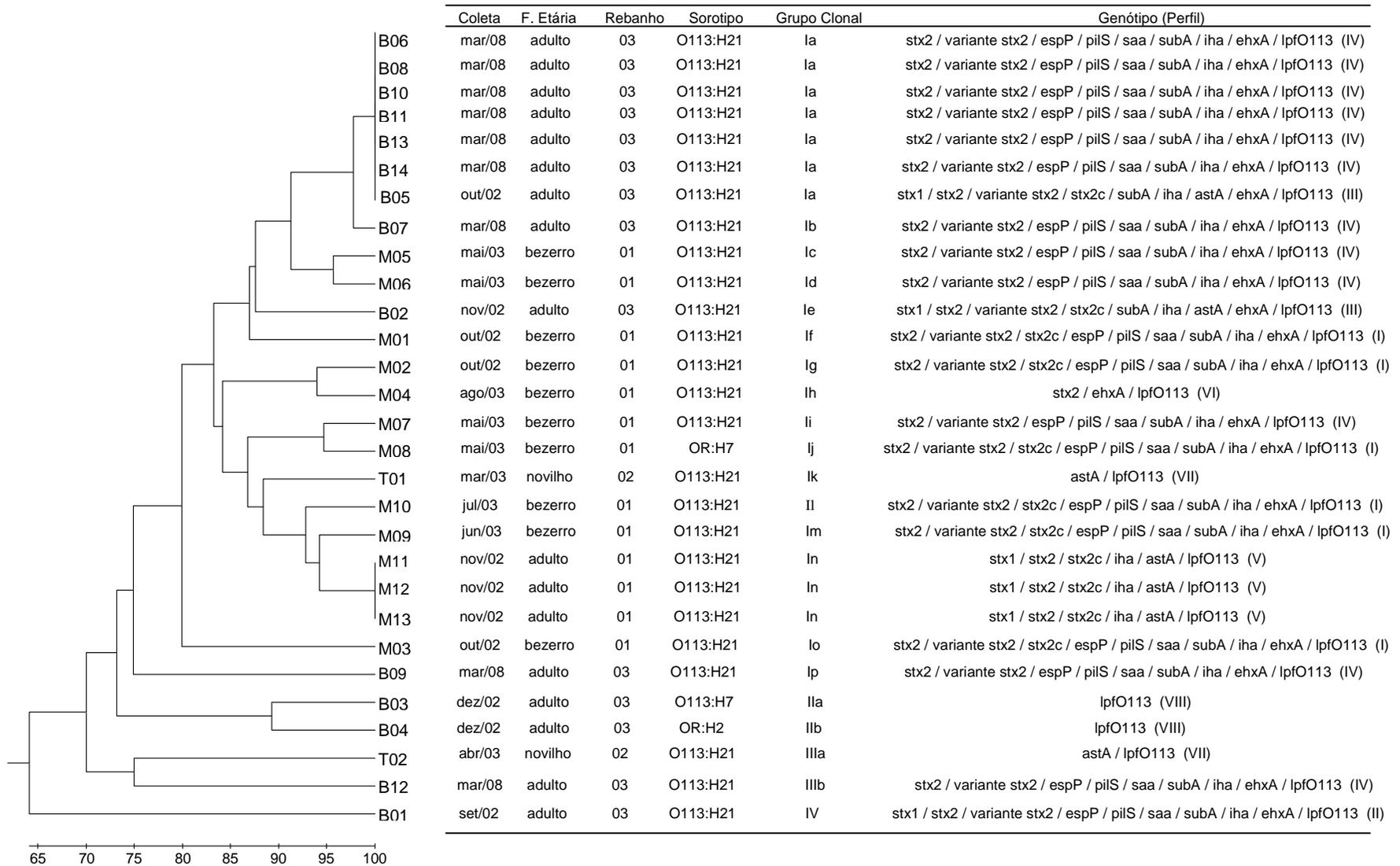


Figura 10 – Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após amplificação randômica (RAPD) com os iniciadores 1252 e 1254 de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ.

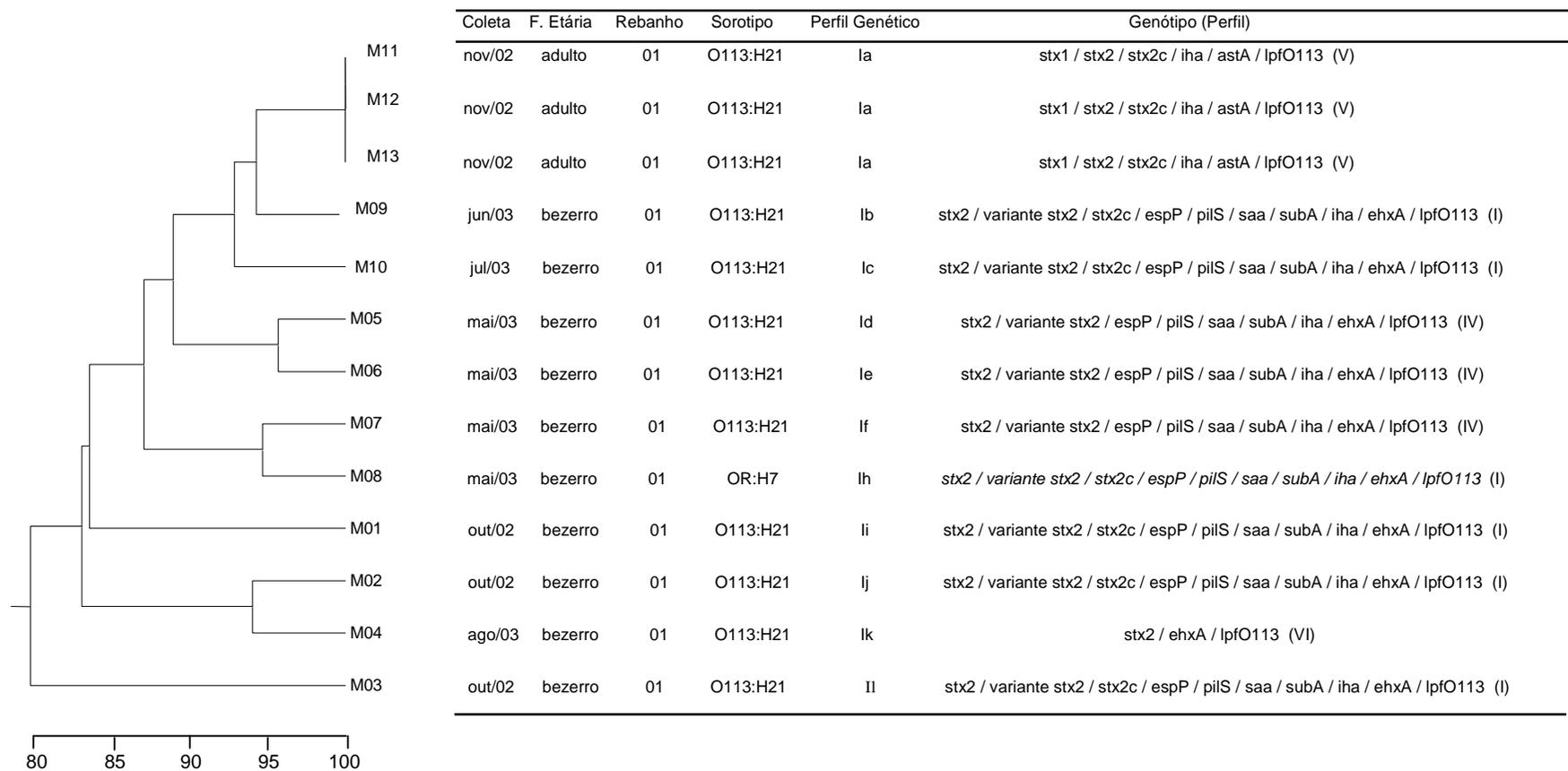


Figura 11 – Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após amplificação randômica (RAPD) com os iniciadores 1252 e 1254 de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios do rebanho 01 em Miracema, RJ.

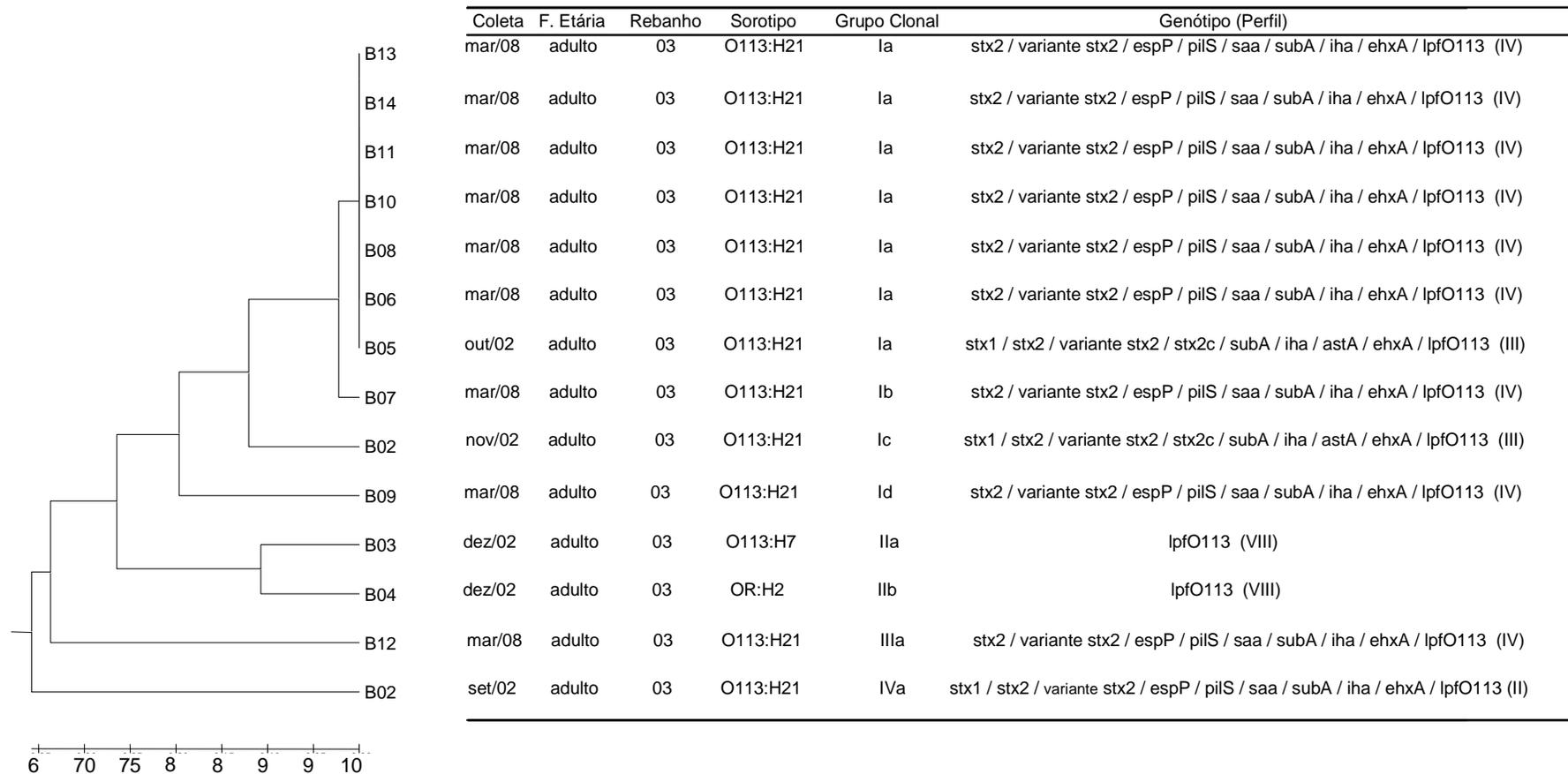


Figura 12 – Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após amplificação randômica (RAPD) com os iniciadores 1252 e 1254 de amostras de *E. coli* *rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios do rebanho 03 em Miracema, RJ.

5.5.2 Perfil genético dos isolados gerados por ensaios de PFGE

Os padrões de restrição gerados por ensaios de PFGE utilizando a enzima *XbaI* demonstraram a ocorrência de 10 perfis distintos com índice de similaridade (IS) mínimo de 63% entre as amostras. Apenas cinco amostras apresentaram perfil não idêntico a nenhuma outra. Dezesesseis isolados pertencentes a três grupos clonais distintos apresentaram IS de aproximadamente 90% entre si.

Todas as amostras com padrões de restrição por *XbaI* idênticos apresentaram o mesmo perfil quando submetidos à restrição com a enzima *BlnI* (Figura 13). Três amostras foram não-tipáveis.

No rebanho 01, quando analisado individualmente, foram detectados três grupos clonais com IS mínimo maior que 75% (Figura 14). Já no rebanho 03, foram observados seis grupos clonais distintos, dentre os quais, dez amostras (76,9%) das 13 apresentaram IS superior a 90%.

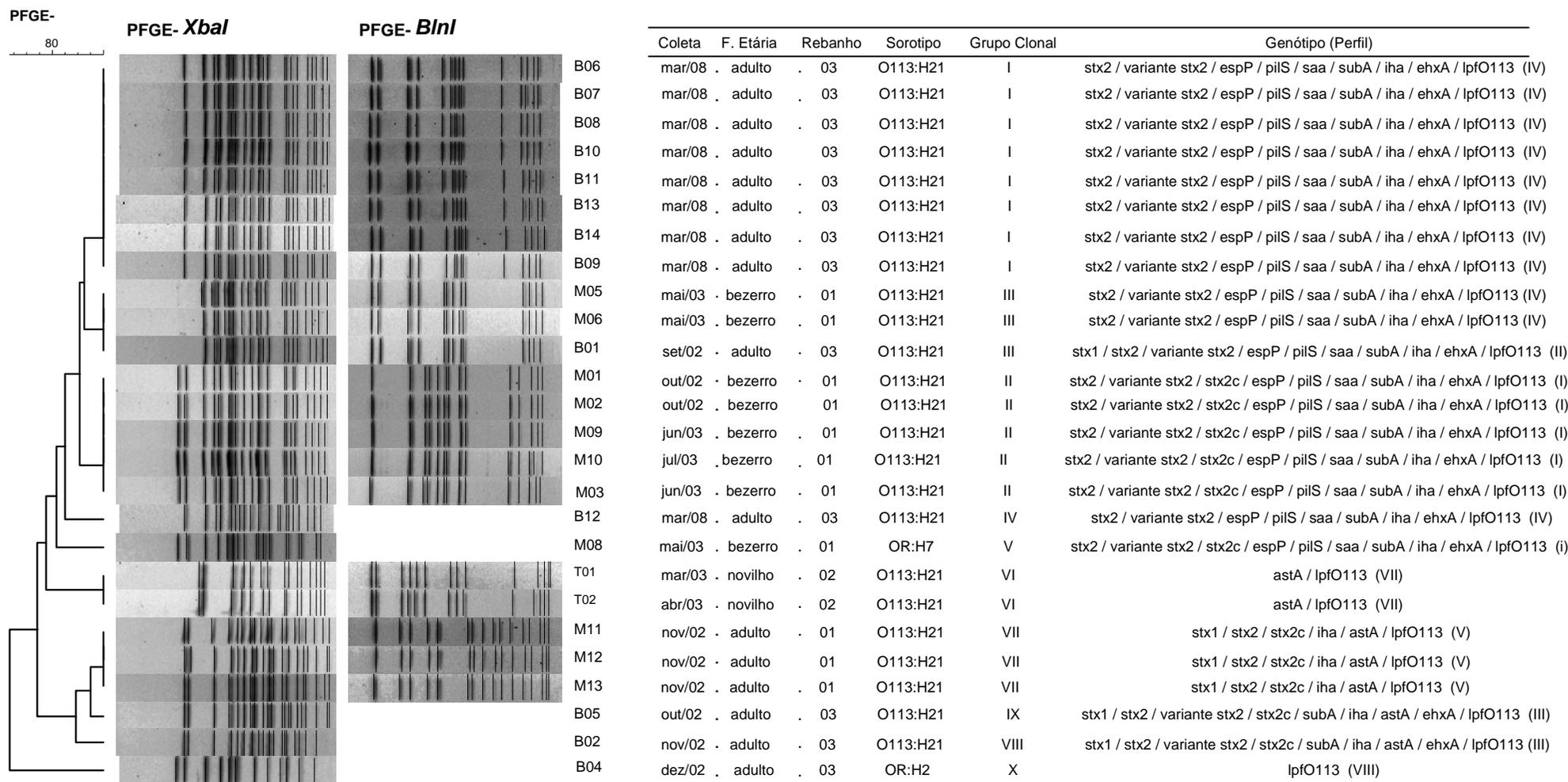


Figura 13 – Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após digestão do DNA, por enzimas de restrição (*Xba*I e *Bln*I), de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos saudáveis em Miracema, RJ.

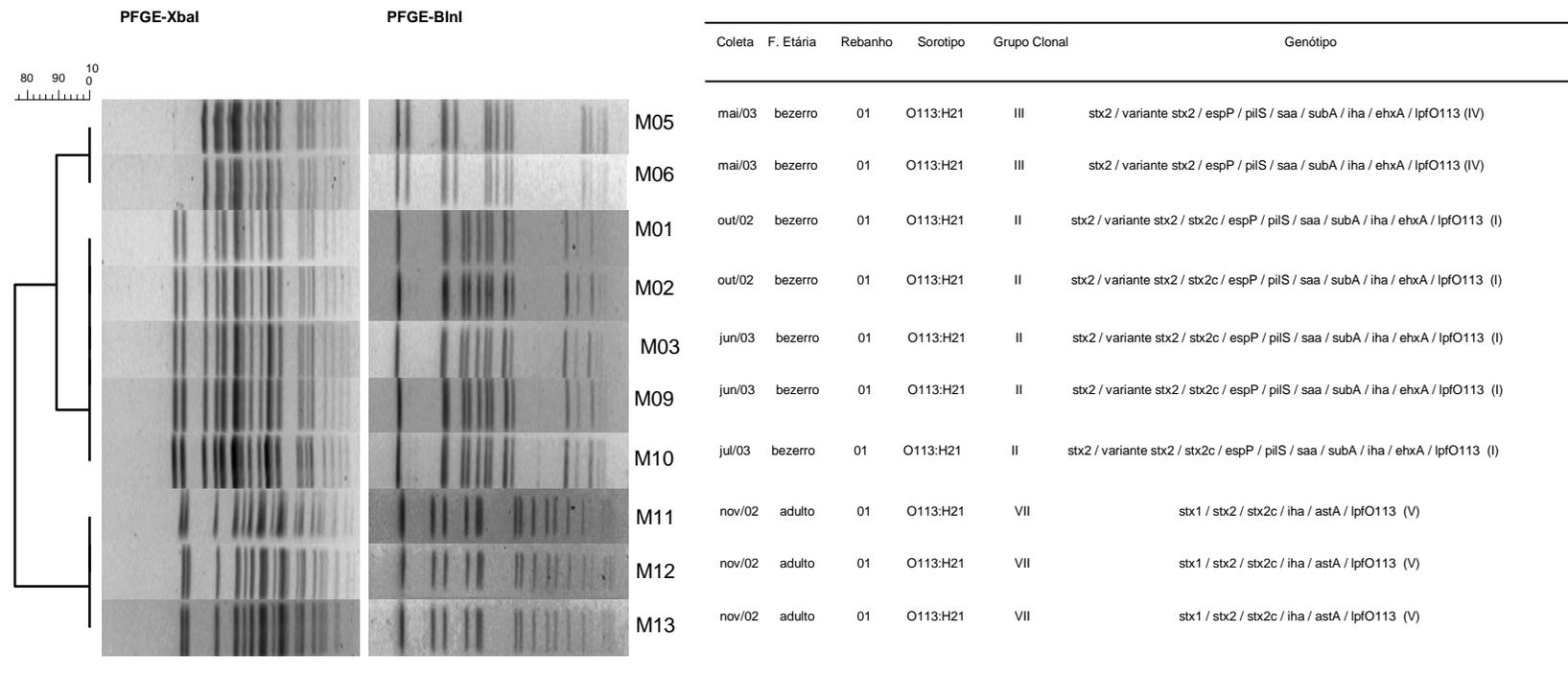


Figura 14 – Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após digestão do DNA, por enzimas de restrição (*XbaI* e *BlnI*), de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos sadios em Miracema, RJ, no rebanho 01.

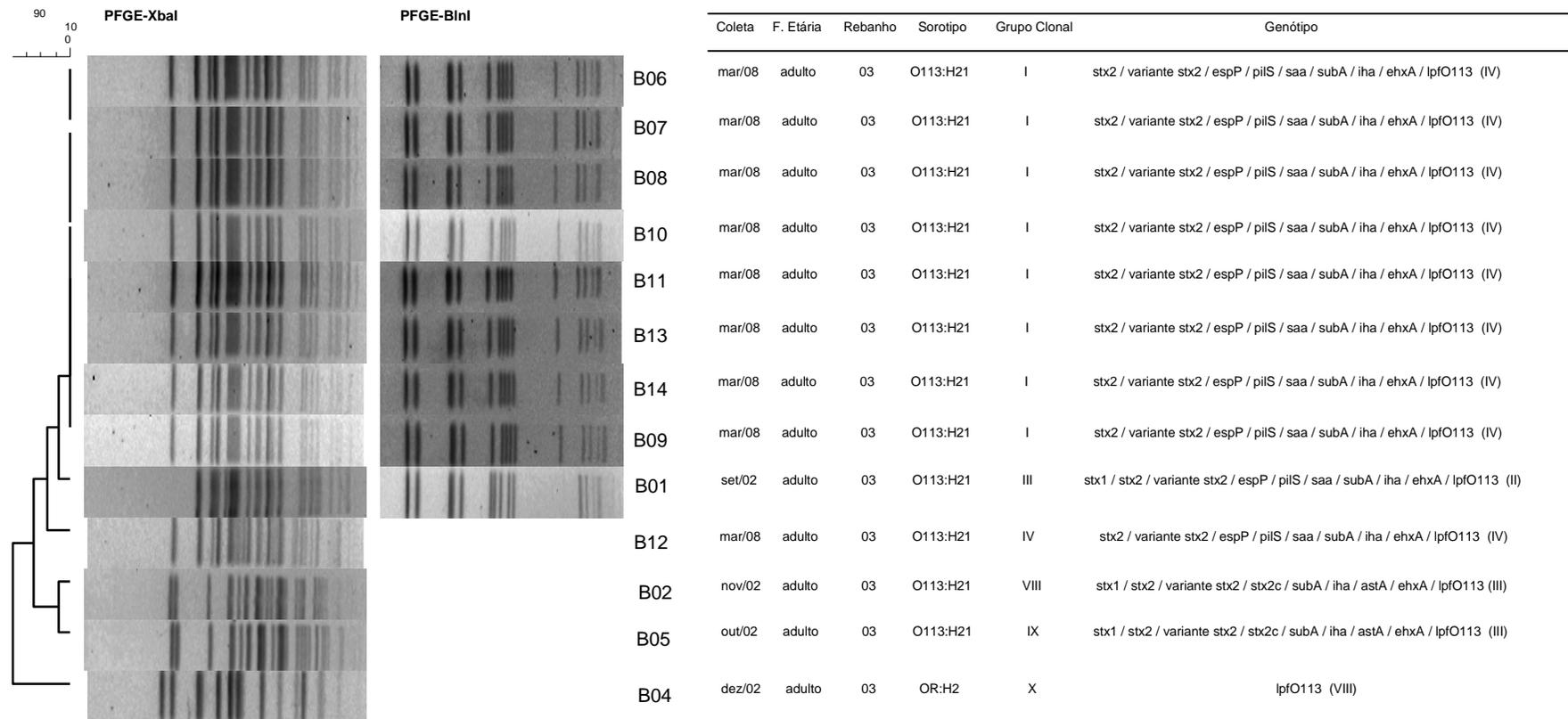


Figura 15 – Figura 14 – Dendrograma gerado pela análise dos padrões de bandas observados após digestão do DNA, por enzimas de restrição (*XbaI* e *BlnI*), de amostras de *E. coli rfb*_{O113} isoladas de material fecal de bovinos saudáveis em Miracema, RJ, no rebanho 03.

5.6 Determinação de amostras distintas após caracterização fenotípica e genotípica

Após a caracterização fenotípica e genotípica dos 29 isolados estudados, pôde-se determinar a existência de 13 amostras distintas (Tabela 07). Foram detectados 10 perfis de restrição distintos por PFGE entre 26 isolamentos. As outras três amostras que não puderam ser testadas por este protocolo foram consideradas como cepas diferentes, uma vez que também não foram semelhantes a nenhum grupo de amostras quando analisadas por RAPD (amostras M04, M07 e B03).

Tabela 07 – Perfis genotípicos e fenotípicos de amostras distintas de *E. coli* rfb0113 caracterizadas no presente estudo

Amostra	Isolamentos	Genótipo
BRJ 01	M01, M02, M03, M09, M10	<i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>stx2c</i> / <i>espP</i> / <i>pilS</i> / <i>saa</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 02	M05, M06, B01	<i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>espP</i> / <i>pilS</i> / <i>saa</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 03	M08	<i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>stx2c</i> / <i>espP</i> / <i>pilS</i> / <i>saa</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 04	M11, M12, M13	<i>stx1</i> / <i>stx2</i> / <i>stx2c</i> / <i>iha</i> / <i>astA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 05	T01, T02	<i>astA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 06	B02	<i>stx1</i> / <i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>stx2c</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>astA</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 07	B04	<i>lpfO113</i>
BRJ 08	B05	<i>stx1</i> / <i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>stx2c</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>astA</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 09	B06, B07, B08, B09, B10, B11, B13, B14	<i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>espP</i> / <i>pilS</i> / <i>saa</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 10	B12	<i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>espP</i> / <i>pilS</i> / <i>saa</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 11	M04	<i>stx2</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 12	M07	<i>stx2</i> / variante <i>stx2</i> / <i>espP</i> / <i>pilS</i> / <i>saa</i> / <i>subA</i> / <i>iha</i> / <i>ehxA</i> / <i>lpfO113</i>
BRJ 13	B03	<i>lpfO113</i>

6 DISCUSSÃO

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é um importante causador de doenças gastrintestinais em humanos, podendo evoluir para problemas sistêmicos como a síndrome urêmica hemolítica (HUS). O sorogrupo O157 é mais associado a surtos de STEC, entretanto, diversos outros sorogrupos já foram associados a doenças em humanos. O sorogrupo O113, em especial o sorotipo O113:H21, tem sido bastante associado a casos graves, sendo responsável, inclusive, por um surto na Austrália (PATON *et al*, 1999). No Brasil, em constraste ao que ocorre com o sorotipo O157:H7, amostras O113:H21 são isoladas com frequência de fezes de animais sadios, principalmente bovinos. Apesar disso, não há casos relatados de infecções causadas por esse sorotipo.

Toxina Shiga é o principal marcador de virulência das STEC e todas as 25 amostras deste estudo que foram capazes de produzir esta toxina carregavam o gene

stx2 e apenas seis, também o gene *stx1*. A baixa ocorrência concomitante de dois tipos de Stx em ruminantes neste estudo confronta dados recentes de estudos em ruminantes onde este perfil é mais freqüente (ISLAM *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2008; OPORTO, *et al*, 2008; VU-KHAC & CORNICK, 2008). Estes mesmos estudos relataram a baixa ocorrência de apenas Stx1 nas amostras e, em amostras STEC O113:H21, a freqüência do tipo um de Stx parece ser ainda mais reduzida (BRETT *et al*, 2003). Acredita-se que o genótipo associado à presença de Stx2 apenas seja mais patogênico do que àqueles relacionados à Stx1, associada ou não ao tipo dois, visto que a sua freqüência foi maior em casos graves de infecções em humanos (OSTROFF *et al*, 1989; THOMAS, SMITH, & ROWE 1993; BOERLIN *et al*, 1999) e comprovou-se que Stx2 purificada é 1.000 vezes mais tóxica para células endoteliais renais de humanos do que Stx1 (LOIUSE *et al*, 1995). Entretanto, a patogenicidade de amostras que carregam ambos os tipos de Stx não pode ser descartada. Foi relatada a produção de superóxidos em células polimorfonucleares induzida por Stx1, o que aumentaria a absorção de Stx2 devido aos danos causados no tecido (KING *et al*, 1999; WAGNER, ACHESON, & WALDOR, 2001).

A ocorrência dos genes *stx2* e *stx2c*, responsáveis pela codificação de variantes do tipo dois de Stx, reforça o potencial patogênico destas amostras isoladas de bovinos sadios, visto que estas variantes estão frequentemente associadas a casos de HUS se comparadas com os outros subtipos (FRIEDRICH *et al*, 2002; ZHANG *et al*, 2005; PERSSON *et al*, 2007). A ocorrência simultânea de tipos e subtipos de Stx (*stx1*, *stx2* e algum gene de variante de Stx2), detectada em seis amostras neste estudo, caracteriza um genótipo potencialmente patogênico para humanos, uma vez que demonstrou ser altamente citotóxico em ensaios fenotípicos

em célula Vero (BERTIN *et al*, 2001). A ausência de amostras positivas para o gene *stx2d* é corroborada por estudos que demonstraram que, apesar de ser encontrada principalmente em amostras LEE-negativas (BEUTIN *et al* 2004), esta variante de Stx2 não é comumente detectada em bovinos, sendo mais freqüentes em ovinos e caprinos (BERTIN *et al*, 2001; RAMACHANDRAN *et al*, 2001). O gene *stx2f* foi identificado em pombos, mas é detectado em bovinos. (SCHMIDT *et al*, 2000).

Quatro amostras foram negativas para os genes da toxina Shiga, assim como não apresentaram efeito citotóxico nos ensaios em célula Vero. Duas destas amostras, positivas apenas para o gene *lpf*_{O113}, não pertencem ao sorotipo O113:H21, porém, ambos os sorotipos já foram associados a casos de doenças em humanos com a presença de Stx (BLANCO *et al*, 2009). Entretanto, os outros dois isolados foram confirmados como O113:H21. Estas cepas foram positivas apenas para os genes *lpf*_{O113} e *ast-A*, não apresentando, também, o genótipo com grande potencial patogênico como observado entre as outras amostras. O mesmo aconteceu com um grupo na Alemanha que detectou amostras não-STECS de *E. coli* O157:H7 e O157:H⁻ causando casos de diarreia em humanos (SCHMIDT *et al*, 1999). Um estudo mais recente relatou amostras O113:H21 não produtoras de Stx em isolados de diarreia em humanos (SANTOS *et al*, 2007). Algumas amostras deste sorogrupo apresentaram características comuns a cepas EAEC. Entretanto, a perda dos genes *stx* não é incomum entre algumas amostras (KARCH *et al*, 1992), o que pode justificar a ocorrência destas amostras STEC-negativas.

A ausência do locus LEE em amostras de STEC O113:H21 não impede que este sorotipo seja associado a casos esporádicos e, inclusive, surto de HUS (PATON *et al*, 1999). Portanto, acredita-se que diversas outras adesinas possam compensar

esta ausência e promover, associadas a outros fatores de virulência, maior patogenicidade para amostras STEC O113:H21.

O gene responsável por codificar uma adesina comum em amostras entero e uropatogênicas (gene *iha*) foi um dos mais freqüentes dentre as amostras deste estudo, demonstrando ocorrência próxima a estudo realizado por TOMA *et al* (2004), no qual se observou a distribuição deste gene por diversos sorotipo, inclusive O113:H21 isoladas de humanos, bovinos e alimentos. Todas as amostras foram positivas para o gene *lpf*_{O113}, que pode agir como uma importante adesina em amostras LEE-negativas visto que a sua deleção levou a redução da aderência de amostras STEC (DOUGHTY *et al*, 2002). Entretanto, este gene foi detectado em amostras de diversos sorotipos além de O113:H21, o que determina que pode ser considerado um importante fator de virulência acessório; porém, não um marcador específico deste sorotipo (TOMA *et al*, 2004).

Houve uma baixa ocorrência do gene *astA*. Apesar de ser um fator de virulência de amostras EAEC, também já foi descrito em amostras de *E. coli* diarreiogênicas (SAVARINO *et al*, 1991; SAVARINO *et al*, 1994; YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996).

Assim como era esperado, todas as amostras foram negativas para os genes *escC*, *escJ* e *efa1* 5' uma vez que todos estão associados a fatores envolvidos na virulência de amostras LEE-positivas. Já os genes *escC* e *escJ* estão envolvidos na codificação de proteínas estruturais do SSTT (KYAW *et al*, 2003). O gene *efa1* codifica uma adesina que se relaciona com a colonização do intestino bovino e situa-se no cromossomo de amostras EHEC O157 (NICHOLLS, GRANT & ROBINS-BROWNE, 2000; KARMALI *et al*, 2003; TOMA *et al*, 2004). As amostras não

apresentaram positividade para o gene *toxB*, cuja adesina ToxB apresenta 47% de similaridade com a adesina Efa1, o que compensaria a falta uma da outra (TOMA *et al*, 2004). Estando este gene presente em um plasmídio, a possível troca entre cepas não pode ser negligenciada, possibilitando um maior grau de patogenicidade. O gene *etpD*, marcador do sistema de secreção do tipo II, não foi positivo em nenhuma amostra, mas está presente em um plasmídio de alto peso molecular de EHEC e é detectado em apenas 10% de amostras STEC LEE-negativas (SCHMIDT, HENKEL & KARCH, 1997). O gene *irp2*, também ausente dentre as amostras, codifica um sideróforo que pode ser encontrado em amostras LEE-positivas ou negativas, assim como em amostras da microbiota. Assim, sua função como fator de virulência seria apenas para conferir maior capacidade de sobrevivência (KARCH *et al*, 1999). O último gene para o qual as amostras foram todas negativas foi *cdt-V*, que codifica uma toxina com efeito letal para a célula sendo frequentemente associada a alguns sorotipos como O113:H21 (KARCH, TARR & BIELASZEWSKA, 2005).

Todas as amostras que foram positivas para o gene *espP*, que codifica uma serina-protease específica de STEC (BRUNDER *et al*, 1999), demonstraram ocorrência simultânea para os genes *saa*, *pilS*, *subA* e *ehxA*. PATON & PATON (2005) observaram ocorrência similar em estudo com um protótipo de STEC O113:H21, no qual a localização do operon *subAB* no megaplasmídeo pO113 era entre os genes *saa* e *pilS*. Os genes *espP* e *ehxA* são frequentemente utilizados como marcadores de alto peso molecular de amostras STEC. Dentre estas amostras com genótipo plasmidial idêntico, apenas uma não apresentou um perfil similar na extração plasmidial. Mesmo após repetições do protocolo, nesta amostra não se detectou a presença de plasmídeo de alto peso molecular, mesmo sendo positiva

para todos os genes plasmidiais estudados. Este fato pode ser em decorrência de alguma alteração sofrida durante o processo de extração do plasmídio, degradando-o. As outras amostras positivas apresentaram perfil similar, mas para poder afirmar que se trata de plasmídios idênticos seria necessária a realização de testes adicionais, como o uso de enzimas de restrição após a purificação do plasmidio. Nas amostras que apresentaram genótipo plasmidial positivo apenas para o gene *ehxA* ou *ehxA/subA*, observou-se uma diferença com relação ao resultado obtido na extração, onde a presença de plasmídios de alto peso molecular não foi detectada como nas demais amostras. Além destas, outras duas amostras possuíam todos os genes plasmidiais estudados neste trabalho, entretanto, mesmo após repetições, não possuía plasmídios de alto peso molecular, apenas alguns de baixo peso. De modo similar, pode-se supor uma eventual dificuldade na extração ou degradação de plasmídios de alto peso presentes. Duas amostras apresentaram plasmídios de alto peso molecular, de tamanho aproximado ao dos observados em outras amostras; porém, não foram positivas para nenhum gene plasmidial estudado, sugerindo a presença de outro fator de virulência ou resistência plasmidial. Um estudo utilizando *katP*, *ehxA* e *espP*, como marcadores plasmidiais, constatou que amostras que não eram positivas para nenhum desses marcadores, ainda assim, apresentavam plasmídios de alto peso molecular (BRUNDER *et al*, 1999).

Em apenas duas amostras que foram positivas para o gene *rfb*_{O113} não foi detectado antígeno O pertencente ao sorogrupo O113; porém, na sorologia, estas apresentaram-se rugosas. O antígeno flagelar destas amostras foi H2 e H7. Os possíveis sorotipos destas amostras (O113:H2 e O113:H7) já foram associadas a casos em humanos (BLANCO *et al*, 2009). Outra amostra apresentou sorotipo

diferente do esperado, O113:H7. Apesar de caso de doença em humanos relacionado com este sorotipo já ter sido relatado, a amostra demonstrou-se não produtora de toxina Shiga, sendo positiva apenas para *lpf*_{O113}. Este perfil também foi encontrado em uma amostra oriunda de caso de diarreia em humano (SANTOS *et al*, 2007) em estudo de distintos patótipos de *E. coli* O113 de diferentes origens no Brasil. Entretanto, é sabido que microrganismos pouco relacionados geneticamente podem ter genes *rfb* idênticos que expressam o mesmo antígeno O (WHITTAM & WILSON, 1988; BILGE *et al*, 1996; WANG & REEVES, 1998; SHIMIZU *et al*, 1999).

De todas as amostras positivas para o gene *ehxA*, apenas três não expressaram o perfil enterohemolítico no teste fenotípico. A não expressão de uma determinada característica fenotípica em amostras positivas para o seu gene não é incomum. Diversos fatores podem estar associados à repressão do gene ou síntese do seu produto.

A fermentação do sorbitol é uma característica comum em STEC O113:H21. Entretanto, amostras não fermentadoras podem ser detectadas, como foi observado neste estudo. Os sorotipos apresentados, diferentes de O113:H21, mostraram-se positivos.

Analisando o perfil de bandas gerado nas reações de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD), observou-se que o iniciador 1254 gerou um número menor de bandas polimórficas. Os grupos eram bastante relacionados entre si (dados não mostrados), o que não condizia com o perfil genético observado. Com o iniciador 1252, a distinção dos perfis era maior e, em consequência disso, a análise dos dados foi realizada a partir da construção de matriz binária onde se combinou os resultados de ambos os iniciadores. Estudos utilizando mais de um iniciador em

ensaios de RAPD demonstraram que o poder discriminatório entre as amostras é maior do que quando apenas um iniciador é usado individualmente (HU, VAN EYSDEN & QUIROS, 1995; HOPINKS & HILTON, 2001).

A utilização de dois iniciadores permitiu uma aproximação maior com os resultados obtidos a partir de ensaios de eletroforese de campo pulsado (PFGE), uma vez que, além de apresentarem grupos similares de amostras relacionadas, o índice de similaridade (IS) de ambas as técnicas foi bem próximo. Apesar do dendrograma gerado por RAPD demonstrar cinco amostras com IS abaixo de 75%, enquanto em PFGE apenas uma apresentou esta característica, algumas amostras não relacionadas na primeira técnica apresentam um baixo IS em PFGE.

As diferenças mais discrepantes existentes entre as duas técnicas podem ser derivadas da presença ou ausência de plasmídeo nas amostras. FONTANA *et al* (1999) relataram que a presença de plasmídios de alto peso molecular pode interferir no perfil de bandas apresentado por PFGE e apesar de muitas amostras apresentarem tais plasmídios, não é possível afirmar que estes sejam idênticos. Assim, o padrão de anelamento dos iniciadores poderia gerar perfis distintos quando comparado com o padrão de restrição das enzimas. Adicionalmente, BROWN *et al* (2009) demonstraram que plasmídios de baixo peso molecular não são capazes de provocar uma interferência no padrão de bandas em PFGE e, uma vez que nos testes de RAPD os iniciadores utilizados possuem um pequeno número de nucleotídeos, mesmo os menores plasmídios poderiam interferir no padrão de bandas apresentado pelas amostras. Assim, é possível que as discrepâncias entre as técnicas sejam em função da ocorrência comum de pequenos plasmídios e, inclusive, de alguns fragmentos menores que, por estarem abaixo do plasmídeo

controle mais leve, não foram incluídos nas análises (dados apresentados). Mesmo com algumas diferenças, não podemos ignorar a importância da técnica de RAPD, que continua sendo uma importante ferramenta no estudo clonal das amostras.

Com a análise dos dendrogramas gerados por RAPD para cada rebanho, foi possível observar que as amostras do rebanho 01 estavam todas relacionadas. Sendo que isolados oriundos de um mesmo animal em vários períodos apresentavam baixo IS e genótipos distintos, indicando que o animal era contaminado com diferentes cepas de STEC O113:H21. Em contrapartida, foi possível observar que isolados oriundos de mesma coleta em um animal demonstraram discrepância na clonalidade e, também, no genótipo apresentado, o que indica a infecção simultânea de mais de uma cepa do mesmo microrganismo.

No rebanho 03, observou-se, a partir de dendrograma gerado por RAPD, que quatro amostras não eram relacionadas com o grupo clonal principal. Foi observada a ocorrência de amostras pertencentes a um mesmo subtipo clonal. Dentre estas, seis eram oriundas de mesma coleta de um animal, com perfil de amplificação de genes de virulência também idênticos, e uma apresentou genótipo diferente das demais. Assim como no primeiro rebanho, também foram observadas amostras oriundas de mesma coleta de um animal apresentando IS inferior a 75%, não estando relacionadas entre si, apesar de demonstrarem mesmo genótipo. Outro grupo de amostras de mesma coleta apresentou alto IS, apesar de não estarem relacionadas com o grupo clonal principal.

Ainda analisando os dados obtidos por RAPD, observou-se que as duas amostras do segundo rebanho não estavam relacionadas, apesar de apresentarem o mesmo genótipo e serem de um mesmo animal sendo coletadas em meses

consecutivos. No principal grupo clonal, com aproximadamente 75% das amostras relacionadas, foi notada a presença de animais dos três rebanhos estudados e IS superior a 90% entre alguns isolados de locais diferentes, sugerindo que, mesmo não sendo amostras clonais, há uma circulação de microrganismos próximos geneticamente naquela região.

A análise realizada a partir do dendrograma gerado por ensaio de PFGE permitiu observar uma clonalidade maior do que a observada entre as amostras por RAPD. Entretanto, da mesma forma que a outra técnica, observou-se isolados distintos oriundo de mesma coleta de um único animal do rebanho 03. Tais amostras apresentaram IS de aproximadamente 85%. Animais deste mesmo rebanho apresentaram os mais baixos IS da análise, inclusive o único abaixo de 75%, sendo as amostras menos relacionadas com o restante. Com a infecção simultânea de um mesmo animal e a distância genética observada neste rebanho, é possível afirmar que há uma circulação de cepas bastante variadas neste ambiente. Alguns isolados do terceiro rebanho coletados no ano de 2008, apresentaram IS aproximado de 94% quando comparados com uma amostra deste local coletada em 2002, sugerindo que as amostras circulantes neste rebanho são bastante próximas, mesmo depois de um período de seis anos. Tanto os clones de 2008 quanto a amostras de 2002 apresentam genótipo potencialmente patogênico para humanos, com ocorrência de Stx1/2 associada a uma variante, além de diversos outros fatores como adesinas e outras toxinas. Estudo realizado no período entre 2003 e 2004 em diferentes propriedades da França também demonstrou a ocorrência de amostras STEC idênticas em distintos animais, assim como o mesmo clone sendo isolado de um animal meses depois (FREMAUX *et al*, 2006). No entanto, este estudo na França

não detectou cepas idênticas isoladas em diferentes propriedades. Diferente do grupo francês, neste estudo foi possível identificar uma amostra de 2002, do rebanho 03, igual a isolados coletados em 2003 em animais do rebanho 01. Com isso, é possível afirmar que, além do microrganismo ser capaz de sobreviver no ambiente por pelo menos oito meses, ainda é uma amostra circulante não apenas do rebanho, mas sim da região, visto que foi detectado em dois rebanhos. A manutenção e circulação deste clone podem estar associadas à capacidade de amostras STEC sobreviverem em bebedouro de animais e amontoados de estrume por meses e até mesmo anos (BOLTON *et al*, 1999; LEJEUNE *et al*, 2001; LEJUENE, BESSER, & HANCOCK, 2001; GUAN & HOLLEY, 2003). Além disso, a proximidade de atividades de pecuária a rios e fontes de água doce podem representar um reservatório importante para patógenos entéricos, permitindo ciclos de re-infecção do gado e, também, disseminação do microrganismo (MCGEE *et al*, 2002).

No rebanho 01, a ocorrência de um único clone foi observada em amostras do mesmo animal coletadas em períodos diferentes (outubro de 2002 e junho de 2003) e, também, em outro animal em dois meses consecutivos (junho e julho de 2003). Tais dados apontam para uma possível persistência no próprio reservatório durante um longo período e, também, no ambiente, visto que a cepa foi capaz de infectar um animal diferente.

As duas amostras do rebanho 02, oriundas de coletas consecutivas de mesmo animal, também apontam para uma cepa persistente no reservatório bovino.

Quando analisados em conjunto, os resultados obtidos demonstram a heterogeneidade de amostras *rfb*_{O113} no reservatório animal. No entanto, o mesmo animal pode carrear amostras distintas, o que foi demonstrado pelas diferenças

detectadas, como por exemplo, com os isolamentos M05 e M06 quando comparados ao isolamento M08, sugerindo a colonização por estirpes distintas ao mesmo tempo, ou em situações ao longo do tempo, como os isolados B01 e B02. Por outro lado, as similaridades entre isolamentos obtidos de animais de um mesmo rebanho (grupo clonal PFGE II) e de rebanhos distintos (grupo clonal PFGE III) sugerem a dispersão de algumas amostras entre os animais e o ambiente.

Ainda não há dados conclusivos na literatura que permitam apontar, com certeza, os fatores de virulência adicionais, além de Stx, essenciais para a patogenicidade destas amostras. Porém, além da visível persistência e disseminação, as amostras estudadas neste trabalho apresentaram, em sua maioria, genótipos potencialmente patogênicos para humanos. É provável que, de modo similar a outros patógenos e estirpes patogênicas de *E. coli*, apenas algumas amostras dentre aquelas que colonizam o reservatório, expressem o conjunto necessário ou suficiente de fatores para determinar sua patogenicidade no ser humano ou no animal. A presença comum de STEC O113 no reservatório animal representa, portanto, um risco que não deve ser negligenciado. Ao contrário, investigações mais amplas devem ser realizadas em busca de estirpes de maior potencial patogênico.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Amostras de STEC O113 com variados perfis de virulência para o homem colonizam o intestino de bovinos sadios, representando um risco iminente de infecção e desenvolvimento de casos graves.
- Há uma alta similaridade genética entre as amostras de *E. coli* *rfb*_{O113} positivas circulantes na região de Miracema; além disso, existem estirpes deste microrganismo capazes de persistir no reservatório animal por um longo período.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, L.J.; CARTER, P.E.; THOMPSON-CARTER, F.M. characterization of a recurrent clonal type of *Escherichia coli* O157:H7 causing major outbreaks of infection in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1632-1635, 2000.

ARMSTRONG, J.; GIBBS, A.; PEAKALL, R. & WEILLER, G. RAPDistance program version 1.03 for the analysis of patterns of RAPD fragments. Australian National University, Canberra, Australia, 1994.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A., ARTHUR, T.M., RIVERA-BETANCOURT, M., NOU, X.; SHACKELFORD, S.D., WHEELER, T.L., KOOHMARAIE, M.. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157:H7 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J. Food Prot.* 66:1978–1986, 2003.

BARLOW, R., GOBIUS, K., DESMARCHELIER, P.. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in retail meats. *Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections*, 29/Outubro–2/Novembro, 2000, Kyoto, Japão, pp. 80.

BERGAMINI, A.M.M., SIMÕES, M., IRINO, K., GOMES, T.A.T., GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 38(3): 553-556, 2007.

BERTIN, Y.; BOUKHORS, K.; PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; MARTIN, C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3060-3065, 2001.

BEUTIN, L., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., ORSKOV, I., ORSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli*(EPEC). *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A.* 267: 576-588, 1988.

BEUTIN, L., MONTENEGRO, M.A., ORSKOV, I., ORSKOV, F., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2559-2564, 1989.

BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 180:167-182, 1991.

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

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 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1099-1108, 2004.

BIDET, P.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; GRIMONT, F.; BRAHIMI, N.; COURROUX, C.; GRIMONT, P.; BINGEN, E. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J. Med. Microbiol.* 54: 71-75, 2005.

BIELASZEWSKA, M., FELL, M., GREUNE, L., PRAGER, R., FRUTH, A., TSCHAPE, H., SCHMIDT, M. A., KARCH, H. Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups. *Infect. Immun.* 72: 1812-1816, 2004.

BILGE, S. S., VARY, J. C., DOWELL, JR., S. F., TARR, P.I. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O-side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.* 64:4795-4801, 1996.

BLANCO, M., BLANCO, J.E., BLANCO, J., GONZALEZ, E.A., MORA, A., PRADO, C., FERNANDEZ, L., RIO, M., RAMOS, ALONSO, M.P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol. Infect.* 117: 251-257, 1996.

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

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M.P.; MOURINO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUAREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet. Microbiol.* 54: 309-319, 1997.

BLANCO, M., PADOLA, N.L., KRUGER, A., SANZ, M.E., BLANCO, J.E., GONZALEZ, E.A., DAHBI, G., MORA, A., BERNARDEZ, M.I., ETCHEVERRIA, A.I.,

ARROYO, G.H., LUCCHESI, P.M., PARMA, A.E., BLANCO, J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol.* 4: 269-76, 2004.

BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., ALONSO, M.P., GONZÁLEZ, E.A., BERNÁRDEZ, M.I. O:H serotypes of human verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC). Disponível em: <<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTIPOSHUM.htm>> Acesso em: 10/03/2009.

BOERLIN, P.; MCEWEN, S.A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R.P.; GYLE, C.L. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 37: 497-503, 1999.

BOLTON, D.J., BYRNE, C.M., SHERIDAN, J.J., MCDOWELL, D.A., BLAIR, I.S. The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 86:407-411, 1999.

BOOHER, S.L., CORNICK, N.A., MOON, H.W. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Vet. Microbiol.* 89: 69-81, 2002.

BONNET, R., B. SOUWEINE, G. GAUTHIER, C. RICH, V. LIVRELLI, J. SIROT, B. JOLY, AND C. FORESTIER. Non-O157 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J. Clin. Microbiol.* 36:1777-1780, 1998.

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

BOUVET, J., BAVAI, C., ROSSEL, R., LE ROUX, A., MONTET, M.P., RAYGUENIOT, S., MAZUY, C., ARQUILLIERE, C., VERNOZY-ROZAND, C. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. *Int. Journal. Food Microbiol.* 71: 249- 255, 2001.

BRETT, K.N.; HORNITZKY, M.A.; BETTELHEIM, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Bovine non-O157 shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2-EDL933* and/or *stx2vhb* subtypes. *J. clin. Microbiol.* 41: 2716-2722, 2003.

BROWN, C.A., HARMON, B.G., ZHAO, T., DOYLE, M.P. Experimental *Escherichia coli* O157 carriage in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:27-32, 1997.

BROWN, D.J., MURRAY, A., MATHER, H., COIA, J.E. Pulsed Field Gel Electrophoresis of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*: the presence of plasmid DNA has implications for the interpretation of PFGE data. Disponível em: <<http://www.blackwellpublishing.com/aphmeeting/abstract.asp?MeetingID=740&id=36507>> Acesso em: 10/03/2009.

- BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; FROSCHE, M.; KARCH, H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology*. 145: 1005-1014, 1999.
- BURLAND, V., SHAO, Y., PERNA, N.T., PLUNKETT, G., SOFIA, H.J., BLATTNER, F.R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* 26: 4196-4204, 1998.
- CAPRIOLI, A.; LUZZI, I.; ROSMINI, F.; RESTI, C.; EDEFONTI, A.; PERFUMO, F.; FARINA, C.; GOGGIO, A.; GIANVITI, A.; RIZZONI, G. Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 169: 208-211, 1994.
- CAPRIOLI, A., MORABITO, S., BRUGÈRE, H., OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36: 289-311, 2005.
- CDC,. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM-South Australia, 1995. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 44, 550 – 551, 557– 558, 1995.
- CERQUEIRA, A.M.F., TIBANA, A., GUTH, B.E.C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from raw beef product in Rio de Janeiro City, Brazil. *J. Food Prot.* 60: 177-180, 1997.
- CERQUEIRA, A.M.F., GUTH, B.E.C., JOAQUIM, R.M., ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 70: 111-121, 1999.
- CHAPMAN, P.A., WRIGHT, D.J., HIGGINS, R. Untreated milk as a source of verotoxinogenic *Escherichia coli* O157. *Vet. Rec.* 133: 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3462-3465., 1996.
- COELHO, A.S., FURUMURA, M.T., YANO, T. Características biológicas de *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) isoladas de amostras de fezes de bovinos com diarréia. *Resumo MMV-056, p.138, In: XVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia.* Santos, SP, Brasil, 1995.
- CRAY, W.C.J. & MOON, H.W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1586-1590, 1995.
- DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; CALL, D.R. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1843-1849, 2003.

DONNENBERG, M.S. 2002. VIII. Infections due to *Escherichia coli* and other enteric gram-negative bacilli. WebMD_ Scientific American _ Medicine. <http://online.statref.com/document.aspx?fxid=48&docid=1046> Acesso Fev. 25, 2009.

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

DOYLE, M.P. & SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2394–2396, 1987.

DOYLE, M.P., PADHYE, V.V., ZHAO, T. Production and characterisation of monoclonal antibodies to Verotoxins 1 and 2 from *Escherichia coli* of serotype O 157:H7. *J. Med. Microbiol.* 30(3): 219-226, 1989.

DYTOC, M.T.; ISMAILI, A.; PHILPOTT, D.J.; SONI, R.; BRUNTON, J.L.; SHERMAN, P.M. Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect. Immun.* 62:3494-3505, 1994.

ELDER, R.O., KEEN, J.E., SIRAGUSA, G.R., BARKOCY-GALLAGHER, G.A., KOOHMARAIE, M., LAEGREID, W.W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2999–3003, 2000.

EWING, W.H. Edwards & Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed., Elsevier Science Publishers, New York, NY, 1986.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1519–1525, 1996.

FAGAN, P.K., HORNITZKY, M.A., BETTELHEIM, K.A., DJORDJEVIC, S.P. Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eae*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (*EHEC-hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 868-872, 1999.

FARAH, S.M.S.S., DE SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., IRINO, K., DA SILVA, L.R., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B.R., 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*, 44(6): 607-612, 2007.

FONTANA, J.L., BAGSHAW, J., ANGULO, F., MARANO, N., SHEA, D., GODDARD, A.F., GEORGE, H. Plasmid DNA Associated with Specific Bands in PFGE Patterns of Antibiotic-Resistant Salmonella Serotype Enteritidis. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999 Sep 26-29; 39: 292 (abstract no. 2342).

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; ROSENSHINE, I.; DONGAN, G.; KAPER, J.B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 30: 911-921, 1998.

FREMAUX, B., RAYNAUD, S., BEUTIN, L., VERNZOY-ROZAND, C. dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet. Microbiol.* 117: 180-191, 2006.

FREMAUX, B., PRIGENT-COMBARET, C., DELIGNETTE-MULLER, M.L., DOTHAL, M. VERNZOY-ROZAND, C. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry *Let. Appl. Microbiol.* 45: 55-61, 2007.

FRIEDRICH, A.W., BIELASZEWSKA, M., ZHANG, W.L., PULZ, M., KUCZIUS, T., AMMON, A., KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* 185:74–84, 2002.

GANNON, V.P.J., RASHED, M., KING, K.R., THOMAS, J.G. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga like-toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1268-1274, 1993.

GARBER, L., WELLS, S., SCHROEDER-TUCKER, L., FERRIS, K. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *J. Food Prot.* 62:307–312, 1999.

GONZALEZ, A.G.M., ROSA, A.C.P., ANDRADE, J.R.C., TIBANA, A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Microbiol.* 17: 321-328, 2000.

GORDEN, J., SMALL, P.L. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61(1): 364-367, 1993.

GRIF, K.; KARCH, H.; SCHNEIDER, C.; DASCHNER, F. D.; BEUTIN, L.; CHEASTY, T.; SMITH, H.; ROWE, B.; DIERICH, M. P., ALLERBERGER, F. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 32: 165-176, 1998.

GRIFFIN, P. M. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States. In: KAPER, J. B. & O'BRIEN, A. D. (Editors), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington, D.C pp. 15-22, 1998.

GUAN, T.Y. & HOLLEY, R.A. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness - a review. *J. Environ. Qual.* 32:383-392, 2003.

GUDONG, W., ZHAO, T., DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2567-2570, 1996.

HACKER, J. & KAPER, J.B. Pathogenicity island and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679, 2000.

HALES, B.A.; HART, C.A.; BATT, R.M.; SAUNDERS, J.R. The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid.* 28: 183-193, 1992.

HANCOCK, D.D., BESSER, T.E., RICE, D.H., HERRIOTT, D. ., TARR., P.I. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol. Infect.* 118:193–195, 1997.

HARMON, B.G., BROWN, C.A., TKALCIC, S., MUELLER, P.O.E., PARKS, A., JAIN, A.V., ZHAO, T., DOYLE, M.P. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J. Food Prot.* 62:574-579, 1999.

HOPKINS, K.L. & HILTON, A.C. Use of multiple primers in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. *BioTechniques.* 30(6) : 1262-1267, 2001.

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

HU, J.; VAN EYSDEN, J. & QUIROS, C.F. Generation of DNA-based Markers in Specific Genome Regions by Two-primer RAPD Reactions. *Genome Res.* 4: 346-351, 1995.

ISLAM, M.A., MONDOL, A.S., DE BOER, E., BEUMER, R.R., ZWIETERING, M.H., TALUKDER, K.A., HEUVELINK, A.E. Prevalence and genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(17): 5414-5421, 2008.

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

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 37: 547-579, 1901.

JENKINS, C., PERRY, N.T., CHEASTY, T., *et al.*: Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol* 41:1775–1778, 2003.

JOAQUIM, R.N.; PRADO, E.H.R.B.; POMBO, C.R.; GONZALEZ, A.G.M.; COUTINHO, C.A.S.; GUTH, B.E.C.; CERQUEIRA, A.M.F.; SOUZA, R.M.; LIBERAL,

M.H.T.; ANDRADE, J.R.C. Occurrence on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and O157:H7 *E. coli* strains in cattle from distinct geographic regions of Rio de Janeiro state. Brazil. *XXI Congresso Brasileiro De Microbiologia*. P104, mh 191, Foz do Iguaçu, 2001.

JOAQUIM, R. M. Dinâmica da infecção e influência de fatores ambientais e populacionais na ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. 1; 109, 2004.

KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15-38, 1989.

KARMALI, M.A., MASCARENHAS, M., SHEN, S., ZIEBELL, K., JOHNSON, S., REID-SMITH, R., ISAAC-RENTON, J., CLARK, C., RAHN, K., KAPER, J.B. Association of genomic *o* island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes that are linked to epidemic and/or serious diseases. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4930-4940, 2003.

KARCH, H., MEYER, T., RUSSMANN, H., HEESEMAN, J. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* 60:3464-3467, 1992.

KARCH, H., SCHUBERT, S., ZHANG, D., ZHANG, W., SCHMIDT, H., ÖLSCHLÄGER, T., HACKER, J. A genomic island, termed highpathogenicity island, is present in certain non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67, 5994-6001, 1999.

KARCH, H., TARR, P.I. & BIELASZEWSKA, M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 405-418, 2005.

KESKIMÄKI, M.; IKÄHEIMO, R.; KÄRKKÄINEN, P.; SCHEUTZ, F.; RATINER, Y.; PUOHINIEMI, R.; SIITONEN, A.. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 as a cause of hemolytic-uremic syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 24: 1278-1279, 1997.

KHAN, A., DAS, S.C., RAMAMURTHY, T., SIKDAR, A., KHANAM, J., YAMASAKI, S., TAKEDA, Y., BALAKRISHNAIR, G. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from diverse sources in Calcutta, India. *J. Clin Microbiol.* 40: 2009-2015. *Emerging Infectious Diseases* • Vol. 8, No. 1, January 2002.

KIM, S., ASAKURA, H., KURI, A., WATARAI, M., SHIRAHATA, T., TAKESHI, K., TSUKAMOTO, T., MAKINO, S. Long-term excretion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and experimental infection of a sheep with O157. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 927-931, 2002.

KING, A.J.; SUNDARAM, S.; CENDOROGLO, M.; ACHESON, D.W.K.; KEUSCH, G.T. Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with

subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters. *J. Infect. Dis.* 179: 503-507, 1999.

KLEANTHOUS, H., SMITH, H.R., SCOTLAND, S.M., GROSS, R.J., ROWE, B., TAYLOR, C.M., MILFORD, D.V. Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. *Arch. Dis. Child.* 65: 722-777, 1990.

KOBAYASHI, H.; SHIMADA, J.; NAKAZAWA, M.; MOROZUMI, T.; POBJANVITRA, T.; PELKONNEN, S.; YAMAMOTO, K. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 484-489, 2001.

KUDVA, I.T., BLANCH, K. AND HOVDE, C.J. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* 64: 3166–3174, 1998.

KYAM, C.M., DE ARAUJO, C.R., LIMA, M.R., GONDIM, E.G.S., BRIGIDO, M.M., GIUGLIANO, L.G. Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). *Infection, Genetics and Evolution* 3(2): 111-117, 2003.

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

LEBLANC, J.L. Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 29: 277-296, 2003.

LEJUENE, J.T., BESSER, T.E., MERRILL, N.L., RICE, D.H., HANCOCK, D.D. Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle. *J. Dairy Sci.* 84:1856-1862, 2001.

LEJUENE, J.T., BESSER, T.E., HANCOCK, D.D. Cattle Water Troughs as Reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3053-3057, 2001.

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

LIESEGANG, A.; SECHSE, U.; PRAGER, R. & 9 OUTROS AUTORES. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H- in Germany – a ten-year study. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 269-278, 2000.

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

- LIRA, W.M., MACEDO, C., MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J. appl. Microbiol.* 97: 861-866, 2004.
- LOPEZ, E.L., CONTRINI, M.M., ROSA, M.F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. In: KAPER, J.B. & O'BRIEN, A.D. (ed). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washinton, DC: American Society for Microbiology. 30-37, 1998.
- LOUIE, M., AZAVEDO, J., CLARKE, R., BORCZYK, ^a, LIOR, H., RITCHER, M., BRUNTON, J. Sequence heterogeneity of the leaE gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol. Infect.* 112: 449-461, 1994.
- LOUISE, C. B., KAYE, S.A., BOYD, B., LINGWOOD, C.A., OBRIG, T.G. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect. Immun.* 63:2766-2769, 1995.
- LUCK, N.S., BENNET-WOOD, V., POON, R., ROBINS-BROWNE, R.M., HARTLAND, E.L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 73: 3063-3071, 2005.
- LUDWIG, K.; BITZAN, M.; ZIMMERMANN, S.; MARKUS, K.; RUDER, H.; MULLER-WIEFEL, D.E. Immune response to non-O157 Vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 174: 1028-1039, 1996.
- MAKINO, K.; ISHII, K.; YASUNAGA, T. e 14 outros autores. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3±3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res.* 5: 1-9, 1998.
- MCDANIEL, T.K., JARVIS, K.G., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 1664-1668, 1995.
- MCGEE, P., BOLTON, D.J., SHERIDAN, J.J., EARLEY, B., KELLY, G., LEONARD, N. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *J. Appl. Microbiol.* 93:706-713, 2002.
- MARQUES, L.M.R., PEIRIS, J.S.M., CRYST, S.F. O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produced a variant of shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 33-38, 1987.
- MARTIN, I.E., TYLER, S.D., TYLER, K.D., KHAKHRIA, R., JOHNSON, W.M. Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. *J. Clin. Microbiol.* 34: 720-723, 1996.

- MASLOW, J.N., SKUTSKY, A.M. & ARBEIT, R.D. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: PERSING, D.H., SMITH, T. F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. (ed) Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. American Society for Microbiology, Washington, DC, 563-572, 1993.
- MATHEUS-GUIMARÃES, C. Características fenotípicas e genotípicas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) do sorotipo O113:H21 isoladas de bovinos em Miracema, RJ. 1; 57, 2006.
- MAULE, A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surface. *Symposium Series for Society of Applied Microbiology*. 29: 71S-78S, 2000.
- MCGEE, P., BOLTON, D.J., SHERIDAN, J.J., EARLEY, B. AND LEONARD, N. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. *Lett Appl Microbiol* 32: 152–155, 2001.
- MECHIE, S., CHAPMAN, C., SIDDON, C. A. A fifteen-month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol. Infect.* 118: 17–25, 1997.
- MELTON-CELSA, A.R. & O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains (ed.) KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D. ASM Press, p.121-128, Washington, DC, USA, 1998.
- MORABITO, S., TOZZOLI, R., OSWALD, E., CAPRIOLI, A. A Mosaic Pathogenicity Island Made Up of the Locus of Enterocyte Effacement and a Pathogenicity Island of *Escherichiacoli* O157:H7 Is Frequently Present in Attaching and Effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 71: 3343-3348, 2003.
- MOREIRA, C.N., PEREIRA, M.A., BROD, C.S., RODRIGUES, D.P., CARVALHAL, J.B. ALEIXO, J.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet. Microbio.* 93: 179-183, 2003.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201, 1998.
- NEI, M. Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press*, New York, 1987.
- NICHOLLS, L.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35: 275-288, 2000.
- NOLLER, A.C., MCELLISTREM, M.C., STINE, O.C., MORRIS, J.G JR., BOXRUD, D.J., DIXON, B., HARRISON, L.H.. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 41:675–679, 2003.

O'BRIEN, A.D. & HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51(2): 206-220, 1987.

OLIVEIRA, M.G., FEITOSA BRITO, J.R., CARVALHO, R.R., GUTH, B.E.C., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.M., KATO, M.A.M.F., RAMOS, I.I., VAZ, T.M.I., IRINO, K. Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Identified as an Important Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(18): 5945–5948, 2007.

OLIVEIRA, M.G., BRITO, J.R., GOMES, T.A., GUTH, B.E., VIEIRA, M.A., NAVES, Z.V., VAZ, T.M., IRINO, K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 127(1-2): 139-146, 2008.

OLSVIK, O., POPOVIC, T., SKJERVE, E. *et al.* Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 43-54, 1994.

OPORTO, B., ESTEBAN, J.I., ADURIZ, G., JUSTE, R.A., HURTADO, A. *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain. *Zoonoses Public Health*, 55: 73–81, 2008.

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

OSTROFF, S.M.; TARR, P.I.; NEILL, M.A.; LEWIS, J.H.; HARGRETT-BAEN, N.; KOBAYASHI, J.M. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J. Infect. Dis.* 160: 994-998, 1989.

PACHECO, A.B.F., GUTH, B.E.C., SOARES, K.C.C., NISHIMURA, L., ALMEIDA, D.F., FERREIRA, L.C.S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1521-1525, 1997.

PADOLA, N.L., SANZ, M.E., BLANCO, J.E., BLANCO, M., BLANCO, J., ETCHEVERRIA, A.I., ARROYO, G.H., USERA, M.A., PARMA, A.E. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 100:3–9, 2004.

PATON, A.W.; RATCLIF, R.M.; DOYLE, R.E.M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LAUSER, J.A.; PATON, J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1622-1627, 1996.

PATON, A. W. & PATON J. C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*,

Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. *J. Clin. Microbiol.* 36: 598-602, 1998.

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

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

PATON, J.C. & PATON, A.W. Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. *Sci. Med. (Phila.)* May/June:28–37, 2000.

PATON, A.W., SRIMANOTE, P., WOODDDROW, M.C., PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for human. *Infect. Immun.* 69: 6999-7009, 2001.

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

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; TALBOT, U.M.; WANG, H.; PATON, J.C. A new family of potent AB₅ cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 1: 35-46, 2004.

PATON, A. & PATON, J. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 43:2944-2947, 2005.

PERNA, N.T., MAYHEW, G.F., POSFAI, G., ELLIOT, S., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B., BLATTNER, F.R. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66: 3810-3817, 1998.

PERSSON, S., OLSEN, K.E.P., ETHELBERG, S., SCHEUTZ, F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J. Clin. Microbiol.* 45:2020–2024, 2007.

PIERARD, D., MUYLDERMANS, G., MORIAU, L., STEVENS, D., LAUWERS, S., Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3317-3322, 1998.

PIRRO, F., WIELER, L.H., FAILING, K., BAUERFRIND, R., BALJER, G. Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostroa and sera of cattle. *Vet. Microbiol.* 43: 131-141, 1995.

- POTTER, M.E., TAUXE, R.V., WACHSMUTH, I.K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29: 985-989, 1991.
- PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; DE CHAMPS, C.; PALCOUX, J.B.; REYNAUD, A.; SCHEUTZ, F.; SIROT, J.; JOLY, B., FORESTIER, C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1023-1031, 2000.
- PRESTON, M.A.; JOHNSON, W.; KHAKHRIA, R.; BORCZYK, A. Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2366-2368, 2000.
- RAMACHANDRAN, V.; HORNITZKY, M.A.; BETTELHEINM, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Sttx2d toxin type. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1932-1937, 2001.
- RIBOT, E. M., FAIR, M.A., GAUTOM, R., CAMERON, D.N., HUNTER, S.B., SWAMINATHAN, B., BARRETT, T.J. Foodborne Pathogens and Disease, 3(1): 59-67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59, 2006.
- RICE, E.W. & JOHNSON, C.H. Short communication: survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle drinking water. *J. Dairy Sci.* 83:2021-2023, 2000.
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *New Engl. J. Med.* 308, 681-685, 1983.
- RIOS, M., PRADO, V., TRUCKSIS, M., ARELLANO, C., BORIE, C., ALEXANDRE, M., FICA, ^a, LEVINE, M.M. Clonal Diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.* 37: 778-781, 1999.
- ROBINS-BROWNE, R.M., ELLIOTT, E., DESMARCHELIER, P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia. P. 66-72. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. KAPER, J.B. & O'BRIEN, A.D. (ed). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1998.
- SAFARIK, I. & SAFARIKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B* 722: 33-53, 1999.
- SAFARIK, I. & SAFARIKOVA, M & FORSYTHE, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 575-585, 1995.

SALVADORI, M.R., DELLA COLLETA, H.H.M., YANO, T. Produção de citotoxinas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. *Resumo MV-071*, p.128, In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, L.F., GONÇALVES, E.M., VAZ, T.M.I, IRINO, K., GUTH, B.E.C. Distinct Pathotypes of O113 *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans and Animals in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 45(6):2028–2030, 2007.

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

SAVARINO, S.J., FASANO, A., ROBERTSON, D.C., LEVINE, M.M. Enteroaggregative *escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in na *in vitro* rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87: 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S.J., FOX, P., DENG, Y., NATARO, J.P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J. Bacteriol.* 176(16): 4949-4957, 1994.

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

SCHMIDT, H., BEUTIN, L., KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 93: 1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H., HENKEL, B. & KARCH, H. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 148:265-272, 1997.

SCHMIDT, H., SCHEEF, J., HUPPERTZ, H.I., FROSCH, M., KARCH, H. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H2 Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37(11): 3491-3496, 1999.

SCHMIDT, H., SCHEEF, J., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., WIELER, L.H., KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx-2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1205-1208, 2000.

- SHIMIZU, T., YAMASAKI, S., TSUKAMOTO, T., TAKEDA, Y. Analysis of the genes responsible for the O-antigen in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Microb. Pathog.* 26:235–247, 1999.
- SIEZEN, R.J., DE VOS, W.M.; LEUNISSEN, J.A.M.; DIJKSTRA, B.W. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng.* 4:719–737, 1991.
- SIEZEN, R.J.; LEUNISSEN, J.A.M. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* 6:501-523, 1997.
- SMITH, H.R. & SCOTLAND, S.M. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 26(2): 77-85, 1988.
- SRIMANOTE, P., PATON, A.W. & PATON, J.C. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 70:3094-3100, 2002.
- STAATS, J.J., CHENGAPPA, M.M., DEBEY, M.C., FICKBOLM, B., OBERST, R.D., Detection of *Escherichia coli* Shigatoxin (*stx*) and enterotoxin (*estA* and *elt*) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Vet. Microbiol.* 94: 303-312, 2003.
- STEVENS, M.P., VAN DIEMEN, P.M., FRANKEL, G., PHILLIPS, A.D., WALLIS, T.S. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect. Immun.* 70: 5158-5166, 2002.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599, 2007.
- TANAKA, Y., YAMAGUCHI, N., NASU, M. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 88:228-236, 2000.
- TARR, P.L. & NEILL, M.A. Perspective: the problem of non-O157 Shiga (verocytotoxin) toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 174: 1136-1139, 1996.
- TATARCZAK, M., WIECZOREK, K., POSSE, B., OSEK, J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet. Microbiol.* 110(1-2):77-85, 2005.
- TATSUNO, I.; HORIE, M.; ABE, H.; MIKI, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; TAGUCHI, H.; KAMIYA, S.; HAYASHI, T.; SASAKAWA, C. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect. Immun.* 69: 6660-6669, 2001.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. E. & SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239, 1995.

THOMAS, A.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Use of digoxigenin-labelled oligonucleotide DNA probes for VT2 and VT2 human variant genes to differentiate Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O157. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1700-1703, 1993.

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

VERNOZY-ROZAND, C., MONTET, M.P., LEQUERREC, F., SERILLON, E., TILLY, B., BAVAI, C., RAY-GUENIOT, S., BOUVET, J., *et al.* Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* 93, 473–478, 2002.

VETTORATO, M.P., LEOMIL, L., GUTH, B.E.C., IRINO, K., PESTANA DE CASTRO, A.F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. *Vet. Microbiol.* 95: 103-109, 2003.

VU-KHAC, H. & CORNICK, N.A. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Vet. Microbiol.* 126:356-363, 2008.

WAGNER, P.L.; ACHESON, D.W.K.; WALDOR, M.K. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 1934-1937, 2001.

WANG, G., WHITTAM, T.S., BERG, C.M., BERG, D.E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic. Acids Res.* 21: 5930-5933, 1993.

WANG, G. & DOYLE, M.P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J. Food Prot.* 61:662-667, 1998.

WANG, L. & REEVES, P.R. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect. Immun.* 66:3545–3551, 1998.

WANG, G., CLARK, C. G., RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3613-3619, 2002.

WANI, S.A., BHAT, M.A., SAMANTA, I., NISHIKAWA, Y., BUCHH, A.S. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 121-126, 2003.

WANI, S.A., SAMANTA, I., BHAT, M.A., NISHIKAWA, Y. Investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 389-394, 2004.

WELLS, J.G., SHIPMAN, L.D., GREENE, J.H., CAMERON, D.N., DOWNES, M.L., MARTIN, M.L., GRIFFIN, P.M., OSTROFF, S.M. ET AL. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29 (5) , 985–989, 1991.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAC, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535, 1990.

WHITTAM, T. S. & WILSON, R.A. Genetic relationships among pathogenic *Escherichia coli* of serogroup O157. *Infect. Immun.* 56:2467–2473, 1988.

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

ZHANG, W., BIELASZEWSKA, M., KUCZIUS, T., KARCH, H. Identification, characterization and distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. clin. Microbiol.* 40(4): 1441-1446, 2002.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, W.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Transcriptional analysis of genes encoding shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 558-561, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)