



Universidade Estadual de Campinas

Leila Aidar Ugrinovich

“Isolamento e caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros no Estado de São Paulo, Brasil”.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>LEILA AIDAR UGRINOVICH</u> <u>[assinatura]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

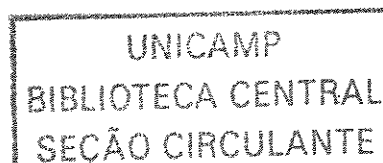
**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de
Microbiologia.**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Co-Orientador – Prof. Dr. Jorge Blanco Alvarez

Campinas

2004



IDADE	30
CHAMADA	17XNICAMP
lg 7x	
0	EX
MBO BC/	61445
OC.	16-86-05
C	☐
D	☒
IEÇO	14.00
ATA	04-2.05
CPD	

Biblid 336⁶ 33675 336765

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ug7i

Ugrinovich, Leila Aidar

Isolamento e caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de bezerros no estado de São Paulo, Brasil / Leila Aidar Ugrinovich. --
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro

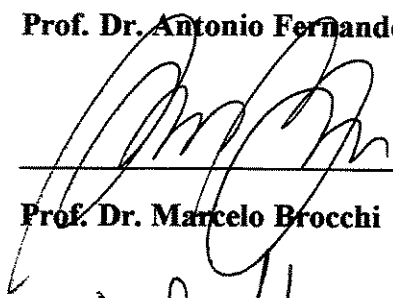
Co-orientador: Jorge Blanco Alvarez

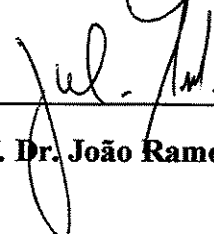
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

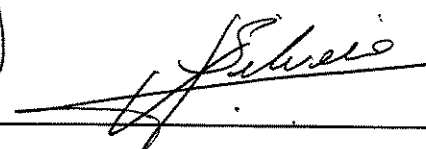
1. *Escherichia coli*. 2. Diarréia. 3. Bezerro. I Castro, Antonio Fernando Pestana de. II Blanco Alvarez, Jorge. III Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

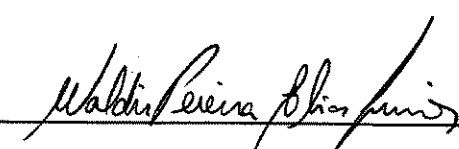
Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral

Suplentes:



Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

200500995

Ao meu marido Ricardo, por seu amor, compreensão e apoio.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, e acima de tudo meu amigo, Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, por sua paciência inesgotável e por sua sabedoria, a qual pude desfrutar todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Jorge Blanco Alvarez, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela – Lugo – Espanha, pela co-orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Miguel Blanco, pela confirmação dos subtipos de intiminas e genes de virulência.

Ao Prof. Dr. Jesús E. Blanco por sua ajuda na sorotipagem das amostras isoladas.

À saudosa Profa. Dra. Marlene Braide Serafim, responsável pelo meu amor à microbiologia.

Ao Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini, sem o qual não poderia ter realizado o teste de Microscopia Eletrônica, por sua delicadeza e simpatia e pelo conhecimento, que me foi transmitido tão gentilmente.

À minha amiga Profa. Dra. Adriana de Sousa Penteado, por todo seu carinho, sua ajuda, seu conhecimento e principalmente sua paciência e amizade.

À Daniela, Eliana, Vânia, Maria Paula, Lika, Nathalia, Tadeu, Ithana, Rodrigo e Jean, por tanto me ajudarem durante todo este tempo.

À Jacinta, Solange e Zelma, por sempre me escutarem e me incentivarem nos momentos que pensei em desistir.

À Alice, Aninha, Naíde, Duvaldo, Concetta, Nancy, S. José, Claudete, Zulmira, Elzinha, por sua amizade e carinho.

À Lourdes, Zaira e Nilvana, por toda sua ajuda.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

Em especial, às minhas amigas de sempre, Fabiana e Luciana, que não somente me incentivaram como me ajudaram a superar todos os momentos difíceis pelos quais passei.

SUMÁRIO

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VIII
II. ÍNDICE DE TABELAS	IX
III. ÍNDICE DE FIGURAS	X
IV. RESUMO	XI
V. ABSTRACT	XII
VI. INTRODUÇÃO	01
VII. OBJETIVOS	13
VIII. MATERIAL E MÉTODOS	14
1. Amostras e técnicas gerais de isolamento	14
1.1. Amostras Padrão para Fatores de Virulência	14
1.2. Amostras estudadas	15
1.2.1. Pesquisa do gene <i>eae</i>	15
1.2.2. Pesquisa dos genes <i>stx1</i> e <i>stx2</i>	16
2. Pesquisa de Fatores de Virulência	17
2.1. Pesquisa de citotoxinas e enterotoxinas	17
2.1.1. Pesquisa de Enterohemolisina (Ehly)	17
2.2. Pesquisa de Adesinas	18
2.2.1. PCR	18
2.2.2. Teste de Adesão à Células HEp-2	18
2.2.2.1. Preparo das Amostras Bacterianas	19
2.2.2.2. Preparo das células HEp-2	19
2.2.2.3. Teste de Adesão	19
2.2.2.4. Teste de Adesão com Seis Horas de Incubação	19
2.3. Pesquisa de intimina	20

2.3.1. PCR	20
2.3.2. Western Blot para detecção de intimina	22
2.4. Fluorescence actin staining test (FAS)	22
2.5. Sorogrupagem e sorotipagem	23
2.6. Pesquisa do local de inserção de LEE	24
2.7. Pesquisa de amostras STEC do sorogrupo O157 através do método de SIM (Separação Imuno Magnética)	25
2.8. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	26
2.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	27
IX. RESULTADOS	28
1. Pesquisa do gene <i>eae</i>	28
2. Pesquisa de subtipos de intiminas	29
3. Inserção de LEE	33
4. Pesquisa de citotoxinas e enterotoxinas	34
5. Pesquisa de adesinas e do plasmídio EAF	42
6. Separação Imuno Magnética	46
7. RAPD	47
8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	47
X. DISCUSSÃO	40
XI. CONCLUSÕES	57
XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
XIII. ANEXOS	77

I - ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AD – Aderência Difusa	SHU – Síndrome Hemolítica Urêmica
ADP – Adenosina Difosfato	K – Antígeno Polissacarídico Capsular
A/E – Attaching and Effacing	LAL – Aderência Localizada Like
AMP – Adenosina Monofosfato	LEE – Locus of Enterocyte Effacement
Arp – Actin Related Protein	LT – Toxina Termo Lábil
ATP – Adenosina Trifosfato	Mda – Megadaltons
BFP – Bundle Forming Pilus	MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
CH – Colite Hemorrágica	NAB – Não Apresentou Bandas
CNF – Fator necrotizante Citotóxico	NC – Não Característica
CS – Cover Slip	NETEC – <i>Escherichia coli</i> Necrotoxigênica
CT – Toxina Colérica	NT – Não Tipável
DAEC – <i>Escherichia coli</i> que Adere Difusamente	O – Antígeno Somático
DEC – <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	PCR – Polymerase Chain Reaction
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
EA – Enteroagregativa	RNA – Ácido Ribonucleico
EAEC – <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa	RTX – Citolisinas formadoras de poros
EAF – EPEC Aderence Factor	Saa – STEC autoaglutinant adhesin
E. coli – <i>Escherichia coli</i>	SIM – Separação Imuno-Magnética
EAST1 – EaggEC heat-stable toxin 1	ST – Toxina Termo Estável
EHEC – <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	Stx – Shiga Toxin
Ehly – Enterohemolisina	STEC – <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga
ELISA – Ensaio Imuno Enzimático	TIR – Translocated Intimin Receptor
EPEC – <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica	VASP – Vasodilatador-stimulated Phosphoprotein
ETEC – <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica	WB – Western BLot
FAS – Fluorescence Actin Staining	W-WASP – Neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein
GMP – Guanosina Monofosfato	
GTP – Guanosina Trifosfato	
H – Antígeno Flagelar	
HLY – Hemolisina	

II - ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Relação de amostras de <i>Escherichia coli</i> padrão para diferentes seqüências gênicas associadas a fatores de virulência	14
Tabela 2.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para pesquisa do gene <i>eae</i>	15
Tabela 3.	Protocolo e componentes utilizados na técnica de PCR	16
Tabela 4.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para pesquisa dos genes <i>stx</i>	16
Tabela 5.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para a pesquisa dos genes que codificam citotoxinas e enterotoxinas	17
Tabela 6.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para a pesquisa de adesinas e do plasmídio EAF	18
Tabela 7.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados para pesquisa de subtipos de intiminas de <i>E. coli</i>	21
Tabela 8.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para pesquisa do local de inserção do LEE em <i>E. coli</i>	24
Tabela 9.	Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para a detecção de <i>rfbO157</i> em <i>E. coli</i>	26
Tabela 10.	Iniciadores utilizados no teste de RAPD	27
Tabela 11.	Subtipos de intimina e porcentagem de detecção por PCR em amostras de <i>E. coli eae+</i> isoladas de bezerras.	30
Tabela 12.	Relação de linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes de bovinos com diarreia, positivas para os genes <i>eae</i> , <i>stx</i> e <i>Ehly</i>	36
Tabela 13.	Relação de linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bovinos sem diarreia, positivas para os genes <i>eae</i> , <i>stx</i> e <i>Ehly</i>	38
Tabela 14.	Números e porcentagens (%) de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bovinos positivas por PCR para diferentes fatores de virulência	41
Tabela 15.	Número de amostras de <i>E. coli</i> isoladas de bovinos com e sem diarreia, positivas para os genes <i>eae</i> , <i>stx</i> e <i>Ehly</i> , associados ou não	42
Tabela 16.	Relação das amostras positivas para o gene <i>saa</i> , detectado nos testes de PCR	42
Tabela 17.	Correlação entre tipo de aderência e presença do gene <i>eae</i> entre as amostras isoladas	43
Tabela 18.	Tipo de adesão e presença do gene <i>eae</i> e lesões A/E em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de bovinos	46
Tabela 19.	Número de amostras isoladas de cada sorotipo encontrado	48

III - ÍDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo de translocação de proteínas codificadas pela região LEE do cromossomo bacteriano, para a célula hospedeira, com conseqüente lesão “attaching and effacing”	06
Figura 2.	Eletroforese em gel de agarose a 1% com resultados do teste de PCR para detecção do gene <i>eae</i> que codifica intimina	29
Figura 3.	Resultado do teste de Western blot para detecção de intimina	31
Figura 4.	Resultado do teste de FAS para detecção de lesões A/E (contraste de fase) Amostra <i>E. coli</i> 937BG(12) (O118:H16)	32
Figura 5.	Resultado do teste de FAS para detecção de lesões A/E (fluorescência) Amostra <i>E. coli</i> 937BG(12) (O118:H16)	32
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose a 1% com resultados do teste de PCR para determinação do local de inserção de LEE	33
Figura 7.	Eletroforese em gel de agarose a 1% com amplificados por PCR dos genes para Stx1 e Stx2 de <i>Escherichia coli</i>	35
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose a 1% com amplificados por PCR do gene que codifica Ehly de <i>Escherichia coli</i>	40
Figura 9.	Linhagem celular HEP-2 inoculada com <i>E. coli</i> de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência difusa – Amostra <i>E. coli</i> Ficha (4)	44
Figura 10.	Linhagem celular HEP-2 inoculada com <i>E. coli</i> de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência Agregativa – Amostra <i>E. coli</i> 15F(11)	44
Figura 11.	Linhagem celular HEP-2 inoculada com <i>E. coli</i> de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência “Localizada-like” – Amostra <i>E. coli</i> 937BG(12)	45
Figura 12.	Linhagem celular HEP-2 inoculada com <i>E. coli</i> de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência Não Característica – Amostra <i>E. coli</i> 61CC(7)	45
Figura 13.	Dendrograma	47
Figura 14.	Resultado do teste de MET para demonstração das lesões A/E	49

IV – RESUMO

Foram isoladas 98 amostras de *Escherichia coli*, portadoras dos genes *eae*, *stx*, ou ambos, entre 264 bezerros diarreicos e 282 bezerros saudáveis, com idade entre 4 a 5 meses. Uma vez positivas em PCR para 1 ou ambos os genes, as amostras foram estudadas quanto presença de genes que codificam para enterotoxinas e citotoxinas: Termo lábil I (LT-I), Termo lábil II (LT-II), Termo estável a (Sta), Termo estável b (STb), Fator necrotizante citotóxico 1 (CNF1), Fator necrotizante citotóxico 2 (CNF2), EaggEC heat-stable toxin 1 (EAST1) e Enterohemolisina (Ehly), sendo que Ehly foi testado também quanto a sua expressão, em ágar sangue.

Entre os animais diarreicos, obtivemos 27 animais (10,2%) *stx* positivos e 15 animais (5,68%) *eae* positivos e entre os animais saudáveis, obtivemos 22 (7,8%) *stx* positivos e 17 (6,03%) *eae* positivos.

Genes para CNF foram encontrados entre 5 (1,9%) animais diarreicos e 4 (1,4%) animais não diarreicos. LT-II foi encontrada em uma única amostra isolada de um animal diarreico. Ehly foi encontrada em 20 (7,6%) animais diarreicos e 22 (7,8%) animais saudáveis. O gene *ast1* foi encontrado em apenas 2 animais, sendo um diarreico e um saudável.

Dos genes que codificam para as adesinas pesquisadas (BFP e Saa), somente *saa* foi encontrado (22 amostras), sendo que o plasmídeo EAF não esteve presente.

As amostras *eae*⁺ foram pesquisadas através de PCR quanto ao subtipo de intimina apresentado, sendo que 17 amostras foram positivas para o subtipo β 1, 15 amostras foram positivas para o subtipo γ 2, 3 amostras foram positivas para ϵ , 2 amostras apresentaram-se ζ ⁺ e 1 amostra apresentou-se μ ⁺. As 10 amostras restantes apresentaram intimina Não Tipável. Também testamos estas amostras quanto à produção da lesão A/E, através do teste de FAS, sendo que 33 amostras apresentaram-se positivas neste teste, 10 apresentaram-se negativas e 5 não puderam ser testadas, pois não aderiram à linha celular HEp-2.

Quando testamos estas amostras *eae*⁺ quanto à inserção de LEE, a grande maioria (37 amostras) apresentou *pheU* interrompido, indicando uma provável presença de LEE inserido neste locus.

Todas as amostras foram testadas quanto à aderência em células HEp-2. Dez amostras apresentaram aderência Difusa (10,20%), 14 apresentaram aderência Agregativa (14,3%), 17 apresentaram aderência Localizada-like (17,3%), 26 apresentaram aderência Não Característica (26,5%) e 25 (25,5%) foram negativas para este teste. Uma amostra demonstrou aderência do tipo Cover Slip (1%) e 5 amostras provocaram descolamento do tapete celular (5%).

O teste de Separação Imuno-Magnética (SIM) não favoreceu o isolamento de nenhuma amostra de *E. coli* do sorogrupo O157 entre as 50 amostras de carne bovina crua e 50 amostras fecais testadas.

V - ABSTRACT

Ninety eight strains of *Escherichia coli* from 264 diarrheic calves and 282 healthy ones were studied. Screening was made based on the presence of genes *eae*, *stx* or both. These 98 strains were also tested for presence of genes encoding toxins: LT-I, LT-II, STa, STb, CNF1, CNF2, EAST1 and Ehly.

Twenty seven diarrheic calves (10,2%) were positive for *stx* genes and 15 (5,7%) were positive for *eae* gene. Among the healthy calves twenty two (7,8%) were positive to *stx* genes and 17 (6,0%) were positive to *eae* gene.

The genes for CNF were isolated from 5 (1,9%) diarrheic calves and 4 (1,4%) non diarrheic ones calves. Only one strain *ltII*⁺ was isolated. The *Ehly* was founded in 20 (7,6%) diarrheic calves and in 22 (7,8%) healthy calves.

When the 98 strains were tested for presence *bfp*, *eaf* or *saa* genes, we only found 22 *saa* positive strains.

From *eae*⁺ strains studied, 17 were positive to gene for β 1 intimin subtype, 15 were positive to γ 2 subtype, 3 were positive to ϵ subtype, 2 were positive to ζ subtype and only one strain was positive to the gene encoding to μ subtype. The 10 remaining strains were non-typable. Among the *eae*⁺ strains, 33 were positive in the Fluorescence Actin Staining test (FAS) and 14 strains react with anti intimin antisera used in Western blot.

These 48 *eae*⁺ strains were tested by PCR to determine the local of LEE insertion into the *E. coli* chromosome. *pheU* interrupted was observed in 37 strains indicating that LEE is probably inserted in this locus.

By the cell culture assay in HEp-2 cells, 10 strains (10,2%) showed diffuse adesion (DA), 14 enteroaggregative adhesion (14,3%), 17 (17,3%) localized like adhesion (LAL), 26 (26,53%) strains showed no characteristic adhesion (NC), 1 strain showed cover slip (CS) adhesion and 25 strains were no adherent to HEp-2 cells.

No O157 strains were isolated by Immunno Magnetic Separation (IMS), either from the 50 raw meat or fecal specimens examined.

VI - INTRODUÇÃO

Escherichia coli foi descoberta em 1885 por Theodor Escherich, que a denominou inicialmente *Bacterium coli* (ESCHERICH, 1885). É um bacilo anaeróbico facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (BLANCO et al., 2002; EWING, 1986; GYLES, 1994; SUSSMAN, 1997).

Em 1947, KAUFFMANN propôs uma forma de diferenciar as amostras de *E. coli* utilizando a determinação dos antígenos de superfície O (somáticos da membrana externa da parede celular), K (capsulares) e H (flagelares). Esta forma de classificação sorológica tornou-se muito útil nos estudos epidemiológicos e de patogenicidade de *E. coli*, facilitando a diferenciação entre amostras virulentas ou não. Atualmente temos 173 antígenos O reconhecidos (O1 a O181), 72 antígenos K (K1 a K103) e 53 antígenos H (H1 a H56), sendo que existem numerosas combinações e sorotipos O:H:K, e algumas são frequentes entre as amostras patogênicas. A determinação dos antígenos O e H é realizada por técnicas de aglutinação, ao passo que a identificação do antígeno K deve ser realizada por contraímunoeletroforese. Ocorrem muitas reações cruzadas entre os antígenos O e K de diferentes amostras de *E. coli*, com antígenos de outros gêneros de enterobactérias. Deste modo é muito importante empregar-se anti-soros absorvidos para evitar-se falsas reações de aglutinação (EWING, 1986; GUINÉE et al., 1981; ORSKOV & ORSKOV, 1984). Todavia nos dias atuais a determinação dos antígenos K raramente é utilizada, definindo-se seu sorotipo pela identificação dos antígenos O e H (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

A bactéria *E. coli* é a principal componente da flora intestinal normal do homem e de outros mamíferos. Uma grande diversidade de amostras comensais de *E. coli* não patogênicas, pertencentes a diferentes sorotipos, podem ser isoladas das fezes de indivíduos saudáveis. Somente em raros casos elas tornam-se um risco para indivíduos normais. Este é o caso de pessoas imunossuprimidas, incapazes de conter esses comensais em seu habitat natural, ou após uma quebra traumática das barreiras do intestino e outros sítios normalmente estéreis do corpo, ou ainda após intervenções cirúrgicas (KUHNERT et al., 2000).

Algumas amostras de *E. coli* são patogênicas e podem produzir infecções entéricas (diarréia, disenteria, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica e doença do edema) ou extra-intestinais (infecções no trato urinário, bacteremias ou septicemias, meningite, peritonite, mastite, infecções pulmonares e de feridas). *E. coli* provoca em seres humanos cerca de 630 milhões de casos de diarréia no mundo e aproximadamente 775.000 mortes ao ano, afetando fundamentalmente a população infantil do terceiro mundo. É o patógeno oportunista mais frequentemente associado com infecções urinárias e septicemias em seres humanos. Em animais domésticos as colibaciloses são muito frequentes, incidindo essencialmente em animais com poucos dias de idade e recém desmamados, ocasionando importantes perdas econômicas no gado bovino, ovino e suíno, assim como nas criações intensivas de aves e coelhos. Em bezerros, leitões e cordeiros *E. coli* pode produzir somente

diarréia, e em aves provoca fundamentalmente infecções respiratórias e septicemias. Também pode causar em ruminantes, suínos, cães e gatos, coliseptissemias em hipogamaglobulinêmicos, infecções urinárias e mastite. A virulência bacteriana é um fenômeno multifatorial. As amostras patogênicas possuem diferentes tipos de fatores de virulência que contribuem conjuntamente para potencializar sua patogenicidade. Amostras de *E. coli* que causam infecções em seres humanos e animais podem compartilhar determinados fatores de virulência e em geral apresentam diferentes sorotipos e possuem adesinas específicas que são responsáveis por sua especificidade quanto ao hospedeiro. Contudo, as amostras de *E. coli* patogênicas para seres humanos podem produzir infecções animais e vice-versa. Também se tem comprovado que os animais podem ser um reservatório de *E. coli* enteropatogênicas para seres humanos, como as EHEC, que causam colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) e formam parte da flora normal intestinal do gado bovino e ovino, onde se comportam, na maioria dos casos, como comensais. Também se tem detectado *E. coli* uropatogênicas que podem causar infecções cruzadas em seres humanos, em cães e gatos, e *E. coli* septicêmicos aviários do sorotipo O18:K1:H7 que apresentam os mesmos genes de virulência que as amostras causadoras de meningite e septicemias em seres humanos (<<http://www.lugo.usc.es/~ecoli/E.coli2.html>>).

As amostras de *E. coli* patogênicas podem ser englobadas em diferentes categorias: EPEC (*E. coli* enteropatogênica) típicas e atípicas, ETEC (*E. coli* enterotoxigênicas), EIEC (*E. coli* enteroinvasoras), STEC (*E. coli* produtora de toxina de Shiga), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), um subgrupo de STEC, AEEC (attaching and effacing *E. coli*), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), NTEC (*E. coli* necrotoxigênica), *E. coli* uropatogênicas e *E. coli* capazes de produzir bacteremia e septicemia. As amostras destes grupos apresentam mecanismos de patogênese específicos, sorotipos distintos e produzem infecções e síndromes diferentes (BLANCO, 1992; BLANCO, 1996; BLANCO et al., 1991a, BLANCO et al., 1991b, BLANCO et al., 1991c, BLANCO et al., 1993b, BLANCO et al., 1996a, BLANCO et al., 1997a, BLANCO et al., 1997b, BLANCO et al., 1998, BLANCO et al., 2001, BLANCO et al., 2002, BLANCO et al., 2003a; DE RYCKE et al., 1990, 1999; DHO & FAIRBROTHER 1999, GAASTRA & DE GRAAF, 1982; HOLLAND, 1990; JOHNSON, 1991; KAPER & O'BRIEN, 1998; LEVINE, 1987; MAINIL, 1999; MILON et al., 1999; MORA, 2002; NATARO & KAPER, 1998; ORSKOV & ORSKOV, 1985; OSWALD, 1999; SOJKA, 1965; SUSSMAN, 1997).

As STEC, e especialmente as EHEC altamente virulentas do sorotipo O157:H7 são importantes patógenos emergentes que causam infecções muito severas em humanos. O gado bovino constitui o principal reservatório deste tipo de microrganismo, sendo a carne moída e os hambúrgueres as principais vias de transmissão. As EHEC do sorotipo O157:H7 têm provocado nos últimos anos um grande número de surtos de CH e SHU. As STEC tem recebido diferentes denominações na literatura científica: VTEC (*E. coli* verotoxigênica, EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e STEC (*E. coli* produtora de Toxina de Shiga) (ARMSTRONG et al., 1996; BLANCO et al., 1993a, BLANCO et al., 1993b, BLANCO et al., 2001, BLANCO et al., 2003a, DUFFY et al., 1999a, DUFFY et al., 1999b, DUFFY et al., 2000, DUFFY et al., 20001a, DUFFY et al., 20001b; GRIFFIN & TAUXE, 1991; KAPER & O'BRIEN, 1998; KARMALI, 1989; MORA, 2002; PATON & PATON, 1998a, REILLY, 1998; SCHMIDT et al., 2001; SLUTSKER et al., 1997; WILLSHAW et al., 1997).

Em seres humanos, as STEC podem provocar CH e SHU principalmente, e também púrpura trombocitopênica, diarreia sanguinolenta e infecções assintomáticas. A forma mais comum é a CH, caracterizada por um quadro severo de dor abdominal e diarreia sanguinolenta. Diferencia-se da disenteria clássica por normalmente ocorrer sem febre e produzir graves complicações, uma vez que 10% dos pacientes terminam desenvolvendo SHU. Esta síndrome afeta fundamentalmente crianças e se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e falha renal aguda, que requer diálise. A taxa de mortalidade de SHU oscila entre 5 e 10% (KARMALI et al., 1985; KARMALI, 1989; LÓPEZ et al., 1989; KLEANTHOUS et al., 1990; CAPRIOLI et al., 1992; BLANCO et al., 1993a; KARCH, 1996; PRATS et al., 1996; SLUTSKER et al., 1997; RIOS et al., 1999; BANATVALA et al., 2001).

Amostras STEC também têm sido identificadas como causa de diarreia e disenteria em bezerros (MAINIL et al., 1993). Vários casos de infecção de bezerros com amostras STEC patogênicas resultam em atrofia das vilosidades, danos nas células epiteliais, infiltração difusa de neutrófilos na lâmina própria e lúmen intestinal, e a formação de pseudomenbranas contendo sangue, fibrina e neutrófilos, de maneira similar ao que ocorre em colite hemorrágica associada com casos de STEC em humanos (HALL et al., 1985; GRIFFIN et al., 1990; PEARSON et al., 1999).

Amostras de STEC bovinas podem produzir dois tipos de toxinas: Stx1 e Stx2, cujos genes são codificados por fagos temperados (MAINIL et al., 1987).

A toxina Stx1 é essencialmente idêntica a “Shiga toxin” produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. A holotoxina Shiga contém uma única subunidade A (de “Active”) de aproximadamente 32kDa, associada com um pentâmero de subunidades B de 7,7kDa (TESH & O'BRIEN, 1991). A subunidade B (de “Binding”) liga-se ao glicolípido da membrana Gb3 (globotriaosilceramida) (JACEWICZ et al., 1986). A subunidade A tem atividade N-glicosidase, que cliva um único resíduo da adenina do componente 28S do RNA ribossômico (RNAr). A resultante inibição da síntese protéica leva à morte da célula afetada (ENDO et al., 1988).

As subunidades A e B de Stx1 e Stx2 tem entre 55 a 57 % de identidade, respectivamente, em sua sequência de aminoácidos (JACKSON et al., 1987).

A Stx é citotóxica para uma variedade de células endoteliais e epiteliais, incluindo células humanas do cólon e células epiteliais do íleo. (MOYER et al., 1987; O'BRIEN & HOLMES, 1987).

A habilidade de Stx causar acúmulo de fluido e lesões histológicas em alça ligada de coelho já foi estabelecida anteriormente (KEENAN et al., 1986; KANDEL et al., 1989). A Stx purificada e administrada oralmente em coelhos jovens muitas vezes resulta em diarreia sanguinolenta e alterações histológicas primeiramente no cólon, com grande infiltração neutrofílica (PAI et al., 1986). Estudos em íleo de coelho demonstram que a Stx parece agir diretamente no ápice das vilosidades estruturais da célula epitelial com maior número de receptores Gb3, fazendo essas células mais susceptíveis a inibição de síntese protéica induzida pela toxina (KEENAN et al., 1986; KANDEL et al., 1989).

Stx não tem efeito na secreção de ânions, mas diminui a absorção basal ativa de NaCl, sugerindo que a indução de acúmulo de fluido seja devida à morte seletiva das células absorptivas das vilosidades, diminuindo a absorção intestinal e provocando a secreção de fluidos. Estas mudanças desregulam o balanço da absorção, favorecendo a secreção de líquidos (CHARNEY et al., 1976).

Muitas amostras STEC têm sido isoladas de gado bovino com diarreia. O exame em Microscopia Eletrônica do trato intestinal de alguns desses animais revelou a ocorrência de lesões epiteliais características, descritas como lesões “attaching and effacing” (A/E), com grande perda das vilosidades e formação de pedestais na membrana da célula alvo idênticas às observadas em EPEC (HALL et al., 1985; MOXLEY & FRANCIS, 1986). Esse fato pode aumentar a virulência dessas amostras STEC para animais suscetíveis (BLANCO et al., 1996c).

Embora amostras STEC tenham sido isoladas em frequência relativamente alta de bezerros com diarreia e sadios (MOHAMMAD et al., 1985; MAINIL et al., 1987; BLANCO et al., 1988; BLANCO et al., 1993a; MOHAMMAD et al., 1993), estudos um pouco mais recentes sugerem que amostras que produzem Stx1 e possuem o gene *eae* necessário para causar as lesões A/E, podem causar quadros diarreicos mais agudos em bezerros (WIELER et al., 1992; DORN et al., 1993; MAINIL et al., 1993; BLANCO et al., 1996a).

Infecção do trato gastrointestinal de gado convencional e de bezerros gnotobióticos com 5 dias de vida por STEC O157:H7 é assintomática (WOODWARD et al., 1999). Porém a infecção com O157:H7 em bezerros neonatos privados de colostro pode resultar em enterocolite similar àquela observada em humanos (DEAN-NYSTRON et al., 1997). Estes animais que não mamaram, contudo, são altamente susceptíveis a infecções e não são modelos ideais para o estudo de enteropatogênese de STEC em gado. Diferentemente do que ocorre para o sorotipo O157:H7 de *E.coli*, o sorotipo O103:H2 é frequentemente isolado de bezerros diarreicos, assim como tem sido associado com doença humana (MARIANI-KURKDJIAN et al., 1993; WIELER et al., 1996).

Amostras de *E.coli* de bezerros produtoras de Stx1 abrigam com maior frequência o “locus of enterocyte effacement” (LEE) do que as amostras produtoras de Stx2 (WIELER, 1992; WIELER et al., 1996). O gado representa um importante reservatório de amostras EHEC (ou enterohemorrágica) O157:H7, também denominadas de STEC O157 (SU & BRANDT, 1995; WHIPP et al., 1994). A maioria dos casos de doenças em humanos por EHEC reconhecidos nos Estados Unidos, assim como em outros países, está associado com a ingestão de carne mal cozida e leite cru. Surtos também têm sido associados a produtos agrícolas contaminados com estrume bovino (DEAN-NYSTRON et al., 1998). O sorotipo de STEC predominante é o O157:H7, que também é o mais comumente envolvido em surtos nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido. Entretanto, amostras pertencentes a mais de 100 diferentes tipos O:H têm sido associadas com doença humana. Entre os sorogrupos mais frequentes, podemos citar o O26, O91, O103 e O111 (PRADEL et al., 2000). Um outro sorotipo que vem surgindo como o mais frequentemente isolado em bezerros na Alemanha e Bélgica, é o O118:H16. Amostras deste sorotipo abrigam genes que codificam para toxinas que as tornam indistinguíveis das amostras EHEC típicas (WIELER et al., 2000). Amostras EHEC colonizam o intestino grosso, podendo causar

tanto surtos como casos esporádicos de Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos (JOHNSON-HENRY et al., 2001).

Baseado na expressão de intimina, nas Stx e na habilidade de provocar lesões A/E, algumas amostras de STEC bovinas são equivalentes às EHEC humanas (KNUTTON, 1994). Assim, duas classes de STEC bovinas têm sido descritas. A primeira possui os genes *eae* e *stx*. A segunda possui apenas o gene *stx* (HOLLAND et al., 1999).

Todas as amostras de EHEC são amostras de STEC caracterizadas pela produção de Stx. Algumas dessas amostras EHEC têm a capacidade de produzir as lesões A/E em linhagens celulares “in vitro” e em intestinos de animais experimentalmente inoculados (JOHNSON et al., 1983; LEVINE et al., 1987; WHIPP et al., 1994). Também são capazes de produzir pequenas quantidades de uma hemolisina (Ehly), que faz parte da superfamília das toxinas RTX, além das lesões A/E. Sua função parece ser a interrupção de importantes funções celulares, juntamente com as Toxinas de Shiga (SCHMIDT et al., 1995).

DEAN-NYSTRON et al., (1998), demonstraram que o gene *eae* é necessário para que amostras de *E. coli* O157:H7 possam colonizar maciçamente o intestino e causar diarreia e lesões A/E em bezerros neonatos e também que o contato íntimo mediado pelo *eae* à mucosa intestinal é crítica para EHEC causar enterocolite fibrinohemorrágica e diarreia em bezerros. Os efeitos no citoesqueleto resultantes das lesões A/E são caracterizados por formação de vesículas, destruição das microvilosidades e rearranjo das proteínas do citoesqueleto celular logo abaixo da bactéria aderida, incluindo filamentos de actina, α actinina, talina, ezerina e cadeia leve de miosina (JOHNSON-HENRY et al., 2001).

Como nas EPEC, a habilidade dessas amostras EHEC e STEC causarem lesões A/E está associada ao LEE (“locus of enterocyte effacement”) (WIELER et al., 1998). Porém, estudos recentes demonstraram que o LEE não é essencial para a patogênese de amostras STEC, tendo em vista vários casos de doenças causadas por STEC, incluindo casos de SHU, causados por amostras LEE negativas (KLEANTHOUS et al., 1990; PATON et al., 1998a).

Os genes que codificam a lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade de 35,5kb (LEE), que organiza-se em cinco operons de funções conhecidas: LEE1 a LEE5. Os loci denominados *E. coli* secretion (esc) que codificam o aparelho de secreção Tipo III encontram-se nos operons LEE1, LEE2 e LEE3; os EPEC secreted proteins (esp) que codificam as proteínas secretadas e suas chaperonas estão em LEE4 e os genes *eae* e *tir*, no operon LEE5 (JARVIS et al., 1995). Dentre as proteínas estruturais secretadas, as EspA, EspB e EspD estão envolvidas na formação do canal onde ocorre a translocação das proteínas efetoras TIR e EspF (CRANE et al., 2001).

EBEL et al. (1998) demonstraram que durante a formação da lesão, a ligação inicial de STEC com a célula hospedeira é mediada por estruturas filamentosas, das quais EspA é a maior componente. EspD é essencial para a formação destes filamentos de EspA (KRESSE et al. 1999), que são requeridos para a translocação de EspB e Tir para a célula epitelial e também para a ativação da transdução de sinais (KENNY et al., 1996; KNUTTON et al., 1998). Propôs-se que apêndices de EspA mediem a interação inicial de

STEC com a célula, e que, posteriormente, esta ligação inicial é substituída pela íntima ligação mediada por intimina e Tir (EBEL et al., 1998).

Tir, em EPEC, aparece como uma proteína fosforilada de 90kDa, na membrana plasmática da célula hospedeira, onde funcionará como um receptor para a intimina. A Tir de EHEC é fosforilada, presumivelmente, nos resíduos de serina e treonina, mas não nos resíduos de tirosina, como em EPEC (GOOSNEY et al., 2001). Ela compreende dois domínios transmembrana, um domínio extracelular ligante para a intimina e dois domínios correspondentes aos terminais N e C. O terminal C da Tir de EPEC contém vários resíduos de tirosina, um dos quais (tirosina 474) é essencial para a formação do pedestal, mas não para a entrega de Tir para a membrana da célula hospedeira (KENNY, 1999).

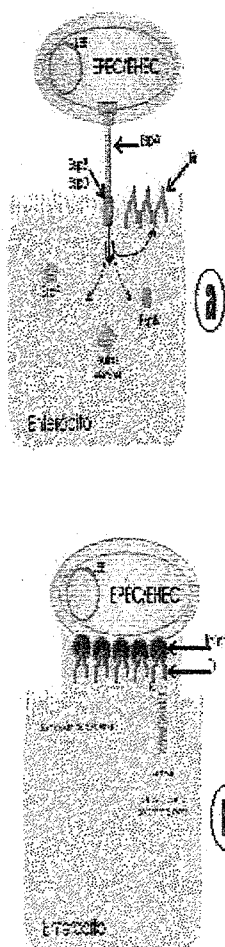


Figura 1: Modelo de translocação de proteínas codificadas pela região LEE do cromossomo bacteriano, para a célula hospedeira, com conseqüente lesão “attaching and effacing”. [a] As EPEC e EHEC utilizando aparato de secreção do tipo III, injetam entre várias proteínas efetoras, EspB e EspD. Estas formam um poro na membrana eucariótica por onde outras proteínas, inclusive Tir, são translocadas. [b] A inserção de Tir na membrana citoplasmática expõe extracelularmente o seu domínio central que se liga à intimina, proteína da membrana externa bacteriana. Esta interação, intimina/Tir, desencadeia eventos celulares que culminam com a polimerização de actina e formação de pedestal.

Adaptado de: CAMPELLONE & LEONG, 2003

Após a inserção de Tir na membrana plasmática da célula hospedeira, várias proteínas do citoesqueleto são recrutadas para o sítio de ligação de EPEC. Estas incluem α -actinina, ezerina, cortactina, talina, fibrina, VASP (“vasodilatador-stimulated phosphoprotein”), vilina, W-WASP (“neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein”) e o

complexo Arp 2/3 ("actin related protein 2 and 3 complex"). N-WASP e o complexo Arp 2/3 são essenciais para a formação do pedestal, assim como α -actinina que foi recentemente demonstrada ligar-se a Tir diretamente, pelo seu terminal N, independentemente da fosforilação da Tir e pode funcionar como uma ligação de Tir diretamente ao citoesqueleto de actina (GOOSNEY et al., 2000; GOOSNEY et al., 2001).

EHEC desencadeia um pedestal similar àquele de EPEC, porém sem a fosforilação da tirosina. Todas as proteínas celulares são recrutadas e localizadas no topo ou no comprimento do pedestal da mesma maneira que em EPEC com exceção das proteínas adaptadoras Grb2 e CrkII (cuja função é mediar interações proteína-proteína), as quais são recrutadas ao longo do pedestal de EPEC, mas não foram encontradas em pedestais de EHEC. Especula-se que talvez EHEC possa "entregar" seus próprios adaptadores à célula hospedeira (GOOSNEY et al., 2001).

Estudos "in vitro" com EPEC, empregando mutantes definidos, demonstraram que a formação dessas lesões A/E inicia-se com uma adesão não íntima da bactéria à célula epitelial, que se considerava ser promovido pelo "bundle forming pilus" (BFP), codificado pelo plasmídeo EAF. Sabe-se hoje que uma das funções principais do BFP é promover uma agregação entre as células bacterianas (*E. coli*), seguindo-se posteriormente um primeiro contato não íntimo. Recentemente, KNUTTON et al., (1999) demonstraram que o BFP também participaria na adesão íntima. É importante salientar que amostras de STEC e/ou EHEC apesar de produzirem a lesão A/E, não possuem o plasmídeo EAF, nem o gene *bfp*. Segue-se a transdução de sinais na célula hospedeira, desencadeada pelas Esps, resultando em rearranjo do citoesqueleto e translocação da Tir para a membrana da célula hospedeira. O último passo envolve a intimina ligando-se à Tir fosforilada para produzir uma adesão íntima característica, com formação do pedestal resultante da reorganização do citoesqueleto e polimerização do citoesqueleto logo abaixo da bactéria aderida (DONNENBERG et al., 1997; KENNY et al., 1997).

A intimina é uma proteína externa de membrana, de 94kDa, responsável pela adesão íntima da bactéria ao enterócito. Foi o primeiro produto relatado como associado à formação das lesões A/E em EPEC. Em seguida um produto homólogo foi descoberto em EHEC O157:H7 (FRANKEL et al., 2001). A atividade de ligação da intimina está localizada na região variável C terminal com 280 aminoácidos. ADU-BOBIE et al. (1998) descreveram subtipos de intimina designados α (alfa), β (beta), γ (gama) e δ (delta), que podem ser identificados através de reação de PCR (Polymerase Chain Reaction). A comparação da sequência de aminoácidos das diferentes intiminas tem revelado que as regiões N-terminais são altamente conservadas enquanto as regiões C-terminais demonstram menor similaridade.

A porção C-terminal da intimina é responsável por sua ligação, e isto sugere que diferentes intiminas podem ser responsáveis por diferentes tropismos na célula hospedeira (PHILLIPS & FRANKEL, 2000). Visto que a intimina é altamente imunogênica, é possível que essa diversidade dentro do domínio do polipeptídeo de ligação à célula seja dirigido pela seleção natural. Pesquisadores usaram métodos imunológicos e genéticos para estudar essa variação antigênica e classificar os domínios de ligação da intimina à célula expressos pelos patógenos que formam lesões A/E. Seus resultados revelaram a presença de pelo menos 5 subtipos de intimina, α , β , γ , δ e uma intimina não tipável expressa por EPEC do

sorotipo O127:H40 (ADU-BOBIE et al., 1998). OSWALD et al. (2000) descreveram um outro subtipo de intimina, denominada intimina ϵ (epsilon) e reagruparam os subtipos de intiminas em β ($\beta 1$ e $\beta 2$) e γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), desaparecendo do esquema anterior a intimina δ . Em 2002, TARR and Whittam descreveram novo grupo, o qual denominaram θ (teta). ZHANG et al. (2002) reportaram três novas variantes, η (eta), ι (iota), e κ (kapa) e em 2003, JORES et al. apresentaram a variante ζ (zeta), demonstrando que a família de intiminas estaria aumentando e confirmando que a recombinação tem representado uma função na história do *eae*. ZHANG et al. (2002), utilizando seus esquemas de tipificação em amostras *eae* positivas isoladas de pacientes com diarreia sugerem que as variantes, η , ι e κ , juntamente com a variante θ (teta), não ocorrem frequentemente em amostras isoladas de humanos. BLANCO et al. (2004b), publicaram um novo trabalho, descrevendo 15 subtipos de intiminas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, $\delta/\kappa, \epsilon$, ζ, η , ι , λ (lâmbda), ξ (xi), μ (mu), ν (nu).

A lesão A/E pode resultar do aumento dos níveis de cálcio na célula infectada. Medidas dos níveis de cálcio em culturas de células infectadas têm demonstrado elevados níveis de cálcio devido a liberação de estoques intracelulares, particularmente nas áreas de colonização bacteriana. Uma função decisiva para o cálcio no desenvolvimento das lesões A/E pode ser vista quando o cálcio intracelular é quelado, com uma conseqüente redução na agregação da actina. Também as mudanças nos níveis intracelulares de cálcio, uma variedade de proteínas permanece fosforilada durante a infecção de culturas celulares. Entre essas proteínas temos a cadeia leve da miosina, as proteínas vinculina e α -actinina e a Tir (KNUTTON et al., 1987; BALDWIN et al., 1990; BALDWIN et al., 1991; ROSENSHINE et al., 1992).

BAIN et al. (1998), demonstraram com técnicas extremamente sensíveis, que não há aumentos significativos nos níveis de cálcio nas células onde a bactéria se aderiu e formou lesões A/E, concluindo que o aumento nos níveis de cálcio não é necessário para a formação das lesões A/E.

Outro importante fator presente em amostras O157:H7, e também em grande parte das amostras EHEC não O157:H7, é a presença do plasmídio de 60Mda. Este plasmídio codifica uma enterohemolisina de EHEC, a catalase-peroxidase, que é uma enzima capaz de proteger o patógeno dos danos oxidativos causados por moléculas de oxigênio reativo produzidos pelos fagócitos e outras células do hospedeiro durante o processo infeccioso e também uma protease de serina, capaz de clivar o fator V da coagulação humana (EspP). Tem sido proposta a utilização deste plasmídio como um marcador para a detecção de EHEC (BEUTIN et al., 1996; BRUNDER et al., 1996; PRADEL et al., 2000).

PATON et al. (2001) descreveram uma nova adesina autoaglutinante denominada Saa ("STEC autoaglutinante adhesin"), em uma amostra O113:H21 LEE negativa, responsável por um surto de SHU. Estes autores demonstraram que o gene *saa* é codificado por plasmídio e associado com genes de enterohemolisina de STEC. O gene *saa* também foi detectado em outros isolados humanos, incluindo outras amostras LEE negativas isoladas de surtos esporádicos de SHU. Isto aumenta a possibilidade de Saa ser um fator de virulência em amostras STEC LEE negativas em humanos, mas o número de amostras estudadas nos testes foi insuficiente para chegarem a conclusões afirmativas.

JENKINS et al. (2003) também descreveram uma significativa associação entre o gene *saa* e amostras STEC isoladas de bovinos, sugerindo que Saa pode ter uma função na sua ligação ao intestino bovino.

Como pretendemos estudar comparativamente os fatores de virulência encontrados em outros grupos de *E. coli* diarreio gênicos (DEC), se torna necessária uma breve exposição destes grupos e respectivos fatores de virulência.

Algumas amostras ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica) também afetam bezerros, principalmente animais recém nascidos e pós-desmamados (ACRES, 1985).

A patogenicidade de amostras ETEC é devida a dois tipos básicos de fatores de virulência, sendo eles a produção de enterotoxinas e a expressão de adesinas, que permitem à bactéria colonizar o epitélio intestinal do hospedeiro.

Tanto a informação para a produção de enterotoxinas como a expressão dos fatores de colonização, residem normalmente em plasmídios que podem codificar conjuntamente para ambos os tipos de fatores de virulência.

As amostras ETEC são capazes de produzir dois grupos de enterotoxinas, a ST ou toxina termo-estável e a LT, ou toxina termo-lábil (BETTEY et al., 1986; ALVAREZ, 1991; BEGUM et al., 1993).

A toxina termo-lábil (LT) é uma proteína antigenicamente, estruturalmente e funcionalmente semelhante à toxina colérica, sintetizada por *Vibrio cholerae*. Existem duas variedades de LT, a LT-I e a LT-II (BLANCO et al., 1991b).

Não ocorre a produção de LT-I em amostras de *E. coli* isoladas de diarreia em bezerros, ou pelo menos este fato não foi ainda confirmado. Por outro lado, a grande maioria das amostras de ETEC bovinas, em trabalhos no exterior (BLANCO, comunicação pessoal; SERIWATANA et al., 1988) principalmente na Ásia, parece produzir a enterotoxina LT-II com grande frequência. No Brasil não havia relatos da produção de LT-II por amostras bovinas. Durante a realização de nossa Tese de Mestrado (UGRINOVICH et al., 2002) entre 52 amostras examinadas, quando procurávamos amostras de *E. coli* hipoteticamente não toxigênicas e não citotoxigênicas, mas portadoras do gene *eae*, surpreendentemente, ao fazermos a triagem, encontramos, por PCR, uma amostra de *E. coli* isolada de bovino positiva para o gene que codifica para produção de LT-II. Tanto quanto saibamos, este foi o primeiro relato no Brasil de amostras de *E. coli* de origem bovina com esta característica.

A LT-I é uma proteína com peso molecular de 85.000 a 90.000d, composta por uma subunidade A, onde reside a atividade enzimática e 5 subunidades B responsáveis pela união da toxina aos receptores epiteliais (gangliosídio GM1) (HOLMES et al., 1986). A subunidade A transloca-se para o interior da célula epitelial intestinal, atuando sobre a regulação da adenil ciclase, ativando-a através de uma ADP ribosilação da porção α da proteína G, que tem como função controlar a conversão de ATP em AMPc. Com a inativação da porção α da proteína G, o AMPc é produzido de modo contínuo. O acúmulo resultante do AMPc intracelular interfere no transporte de sódio e cloro, provocando

acúmulo de água e eletrólitos no lúmen intestinal (GILL et al., 1980; HOLMES et al., 1986).

A informação genética da síntese de LT-I situa-se em plasmídios transmissíveis (*toxA* e *toxB*) (BETTEY et al., 1986).

O gene *ltb* que codifica para a síntese de LT-II parece estar localizado no cromossomo bacteriano (BLANCO et al., 1992a). A LT-II não se relaciona imunologicamente com LT-I ou CT. É produzida em títulos mais baixos. Seu peso molecular é de 87.000d e também ativa a adenil ciclase (PALVA et al. 1981; GUTH et al., 1986; HOLMES et al., 1986). A toxina LT-II foi primeiramente identificada em amostras de *E. coli* isoladas de animais e raramente é encontrada em amostras de *E. coli* de origem humana. A subunidade A de LT-II demonstra 55 a 57% de identidade com a subunidade A de LT-I e CT, porém, a subunidade B de LT-II não apresenta nenhuma homologia com LT-I ou CT (SEARS & KAPER, 1996).

Outro grupo de toxinas produzidas por ETEC é a ST, ou toxina termo-estável. Essa toxina também possui 2 variedades, a STa e a STb. A STa é solúvel em metanol e causa diarreia em camundongos lactentes. A STb é insolúvel em metanol, não afetando camundongos lactentes, mas causa acúmulo de fluido em alça intestinal de porcos pós-desmamados com 6 a 8 semanas de idade (BLANCO et al., 1991b). WHIPP (1990) descobriu que a STb era sensível às proteases e que a utilização de inibidores de tripsina de soja em ratos e nos testes de alça ligada realizados em camundongos tornavam estes animais susceptíveis à sua atividade biológica da STb, revelada pelo acúmulo de fluido nas alças. Tanto quanto sabemos, esta enterotoxina não ocorre ou não foi descrita em amostras de colibacilos de bovinos com diarreia.

Assim sendo, amostras ETEC bovinas parecem sintetizar somente a enterotoxina STa, que é um peptídeo com 17-18 resíduos de aminoácidos, portanto com baixo peso molecular, que ativa a guanil-ciclase nas células do epitélio do intestino delgado, o que provoca aumento na concentração de GMP cíclico (BLANCO et al. 1992a). Os genes que codificam a produção de STa encontram-se em plasmídios que também podem conter informação genética para a síntese de LT-I, fatores de colonização e resistência a antibióticos (BETTEY et al., 1986; THOMPSON, 1987; DANBARA et al., 1988; BLANCO et al., 1991a).

Devido ao seu baixo peso molecular, a enterotoxina STa não é imunogênica em condições naturais, a não ser quando acoplada a proteínas. Quando se consegue a produção de anticorpos, nestas condições, podem ser usados testes sorológicos, em especial o teste de ELISA. Sua detecção até a algum tempo só era feita pelo teste do camundongo recém-nascido (DEAN et al., 1973), porém, atualmente, têm sido utilizados testes de hibridação de DNA ou a Reação em Cadeia da Polimerase, que permitem a detecção da presença do gene *estA*, associado a seu transposon, que codifica a enterotoxina. STa é codificada pelo gene *estA* associado a um transposon, que está localizado em plasmídio. Ela age pela sua ligação a um receptor intestinal protéico na microvilosidade da membrana celular. O número desses receptores no intestino diminui com o aumento da idade do indivíduo (SEARS & KAPER, 1996).

O gene *estB*, que codifica a proteína STb e que está associado a um plasmídeo, codifica uma proteína precursora de 71 aminoácidos, contendo quatro cisteínas que são proteoliticamente processadas no espaço periplasmático para uma proteína de 48 aminoácidos com 2 ligações dissulfídicas. Esta proteína é secretada extracelularmente. STb induz perda ou atrofia parcial da vilosidade (SEARS & KAPER, 1996).

Amostras de *Escherichia coli* capazes de produzir CNF (fator necrotizante citotóxico) foram primeiramente reconhecidas em amostras isoladas de diarreia, e são genericamente denominadas de *E. coli* necrotoxigênicas (NTEC) (CAPRIOLI et al., 1983).

Além de enterite, amostras CNF positivas demonstram estarem associadas com infecções extraintestinais no homem, incluindo septicemia e infecções do trato urinário (ALONSO et al., 1987; ALONSO et al., 1992). Amostras produzindo CNF também têm sido detectadas em enterite em leitões e bezerros (CAPRIOLI et al., 1983), porém, GONZÁLEZ et al. (1989), descreveram a presença de amostras NTEC em bezerros sem diarreia.

Esta toxina não é excretada para o meio de cultura, sendo necessário o rompimento da bactéria para sua detecção. Ela é capaz de causar necrose em pele de coelho, provocar o aparecimento de células gigantes multinucleadas em várias linhagens celulares, como HeLa, Vero, CHO e HEP-2. O CNF impede a divisão celular, sem interferir na replicação do ácido nucléico, formando células maiores, com vários núcleos de tamanho dez vezes superior ao tamanho normal. A toxina CNF excretada por amostras bovinas é igual à CNF excretada por amostras de origem humana, sendo necrótica em pele de coelho e letal para camundongos inoculados intraperitonealmente (BLANCO et al., 1992a; BLANCO et al., 1994).

O mecanismo de ação dessas toxinas é desconhecido. Entretanto, CNF1 altera o arranjo de F-actina e tubulina em células, diminui o número de microvilosidades em células epiteliais não intestinais, e induz células epiteliais a tornarem-se fagocíticas. Essas mudanças no citoesqueleto celular precedem o desenvolvimento da multinucleação e parecem ser responsáveis pela subsequente divisão celular. (SEARS & KAPER, 1996).

Existem dois tipos de toxinas CNF com atividades biológicas similares e imunologicamente relacionadas: CNF1, que caracteriza-se por induzir multinucleação acompanhada por arredondamento e aumento do tamanho da célula HeLa. A CNF2, induz um grau de multinucleação é menor e as células HeLa sofrem um alongamento com perda parcial de viabilidade. A produção de CNF1 é típica de NTEC causadora de infecções extraintestinais humanas e CNF2 é característica de *E. coli* de origem bovina (BLANCO et al., 1992a; BLANCO et al., 1994). Somente CNF2 é capaz de induzir necrose na região plantar da pata de camundongos e produzir um acúmulo de fluido no teste de alça ligada de coelho. CNF1 e CNF2 são proteínas termolábeis de 115 e 110 kDa, respectivamente (BLANCO et al., 1992a; BLANCO et al., 1994).

Os genes responsáveis pela produção de CNF2 localizam-se em plasmídios transmissíveis de 80 Md e os responsáveis pela produção de CNF1 encontram-se no cromossomo bacteriano (BLANCO et al., 1992a; BLANCO et al., 1992b; BLANCO et al., 1994).

Estudos feitos por FALBO et al. (1992) demonstraram a ligação de genes codificando a produção de CNF e Hly no cromossomo de isolados extraintestinais de NTEC.

Outro grupo de *Escherichia coli* que tem merecido a atenção de vários pesquisadores é o das enteroagregativas ou EAEC (enteroaggregative *Escherichia coli*). Estas amostras fenotipicamente caracterizam-se pelo tipo de adesão que apresentam em células HEp-2, caracterizada sobretudo por formar alinhamento de bactérias ao redor, e também a certa distância da célula HEp-2, mostrando agrupamentos como se fossem pilhas de tijolos. Autores indianos (BHAN et al., 1989; GHOSH et al., 1992), descreveram uma associação destas amostras com a ocorrência de diarreia protraída em crianças, levando a um atraso do desenvolvimento físico e mental. Pesquisas de outros autores demonstraram que a maior parte destas amostras produzem dois tipos de fimbrias, denominadas de AAF/I e AAF/II apresentando ainda um plasmídeo de 60Md, com cuja sequência foi preparada uma sonda CVD432, que supostamente, pelo menos no início, identificava todas as EAEC (ELIAS et al., 1999).

SAVARINO et al. (1991) demonstraram que amostras de EAEC, na sua quase totalidade, produzem uma enterotoxina termolábil, que foi designada de EAST-1, codificada por *ast* (plasmidial), mas que por si só não seria suficiente para explicar a atividade diarreogênica de EAEC. Além do mais se verificou que a presença do gene *ast* era encontrada em outros grupos de DEC e até mesmo em outras enterobactérias.

Em 1996 foi descrito um surto em Osaka, Japão, devido a *E. coli* O166:H15, cujo único traço de virulência era a presença do gene *astA*, que codifica EAST-1 (NISHIKAWA et al., 1999). A EAST-1 é uma enterotoxina de 38 aminoácidos que ativa a guanil-ciclase, assim como a STa de ETEC. O gene que codifica EAST-1 também pode ser encontrado em amostras ETEC patogênicas para humanos, em subgrupos das amostras que aderem difusamente (DAEC) isoladas de pacientes com diarreia e em animais domésticos (YAMAMOTO & NAKAZAWA, 1997), o que nos leva a crer na possibilidade de encontrarmos o gene que codifica esta enterotoxina entre as amostras isoladas de bovinos no Brasil.

VII - OBJETIVOS

- ♦ Isolar amostras de *Escherichia coli* portadoras dos genes *eae* e *stx1* e/ou *stx2*, determinando seu sorotipo. Pesquisar entre as amostras *eae* positivas isoladas, os genes que codificam para os subtipos de intimina, a saber: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, $\delta/\kappa, \epsilon$, ζ, η , ι , λ , μ , ν , o local de inserção do LEE, bem como a presença das lesões A/E. Pesquisar entre as amostras de STEC *eae*- e *stx*+ a presença de *saa*. Observar através de testes de aderência se as amostras isoladas demonstram adesão a linhagem celular HEP-2 e qual o tipo de adesão apresentado. Determinar nas amostras isoladas a presença de genes de virulência que ocorrem em outros grupos de *Escherichia coli* diarreiogênicas (ECD), mais especificamente, LT-I, LT-II, STa, STb, CNFs e EAST. Realizar análise clonal de algumas das amostras que estejam associadas a casos de CH e SHU. Utilizando a técnica de separação imunomagnética e meios seletivos tentar isolar de fezes de bovinos e de alimentos “in natura” preparados a partir de carne bovina, amostras de STEC O157:H7.

VIII - MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras e técnicas gerais de isolamento.

1.1. Amostras Padrão para Fatores de Virulência

As amostras padrão utilizadas em nossas pesquisas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Relação de amostras de *Escherichia coli* padrão para diferentes seqüências gênicas associadas a fatores de virulência.

Amostra	Padrão para:
<i>E. coli</i> E2348/69 (EPEC)	Aderência Localizada; gene <i>eae</i> , lesão A/E e teste de FAS, Intimina α
<i>E. coli</i> O8 TR 302 (DAEC)	Aderência Difusa
<i>E. coli</i> O431-1 (EAEC)	Aderência Agregativa, EAST1
<i>E. coli</i> K12 C600	Amostra negativa para todos os testes
P-17	LT-I, STb
B62	LT-II
FVL-2	CNF1
B26a	CNF2
FV420	STa
O157-157	Stx1, Stx2, <i>eae</i> O157, Ehly
B66	LT-II
<i>E. coli</i> O26:H11	Ehly
STEC O157:H7 (EDL933)	Intimina γ 1, <i>rfb</i> O157, SIM
STEC VTB-308	Intimina γ 2
STEC-VTB-286	Intimina ϵ
STEC-VTO-50	Intimina ζ
EPEC-2348	Intimina α 1
AEEC-IH2498a	Intimina α 2
REPEC-RDEC-1	Intimina β 1
EPEC-359	Intimina β 2
STEC-TW07926	Intimina θ

Tabela 1. Continuação:

Amostra	Padrão para:
AEEC-6044/95	Intimina κ
AEEC-CF11201	Intimina η
AEEC-7476/96	Intimina ι
AEEC 68-4	Intimina λ
EPEC-373	Intimina μ
AEEC -1H1229a	Intimina ν

1.2. Amostras Estudadas

Foram utilizados suabes estéreis para coleta via anal, os quais foram imediatamente inoculados em meio de transporte Stuart (Stuart CLR – CE0373 – MEUS Piove di Sacco - Italy). Procedeu-se em seguida a semeadura em meio de MacConkey, sendo estes incubados a 37°C por 24 h. Da zona de maior crescimento foram feitas reações de PCR para a detecção de *eae* e *stx* (s). Das placas de MacConkey positivas foram escolhidas aleatoriamente colônias isoladas para se detectar qual ou quais delas apresentavam os genes.

Foram isoladas 98 amostras de *E. coli*, a partir de 546 espécimes fecais coletados de bezerros com idade máxima de 5 meses, com diarreia (264-amostras caso) e sem diarreia (282 amostras-controle), das regiões de São Paulo e Campinas. As amostras foram identificadas através de provas bioquímicas utilizando os meios EPM, MILi e Citrato, conforme rotina do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP e também no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

A partir das amostras *eae*+, *stx*+ e *eae*+*stx*+ isoladas, procedeu-se a detecção dos outros fatores de virulência.

1.2.1. Pesquisa do gene *eae*

A pesquisa do gene *eae* foi realizada através do teste de PCR, utilizando-se os iniciadores e temperaturas mostrados na Tabela 2 (GANNON et al., 1993):

Tabela 2: Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para pesquisa do gene *eae*.

GENE	Iniciadores	Temp. (°C)	Tam.(pb)
<i>eaeA</i> A	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC	56	815
B	GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG		

Cada amostra foi tratada conforme protocolo de reação de PCR discriminado na Tabela 3:

Tabela 3: Protocolo e componentes utilizados na técnica de PCR.

COMPONENTES	VOLUME (µl)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água Milli-Q estéril	(qsp – 50)	—
10x “PCR Buffer plus 50mM MgCl ₂ ” (Pharmacia)	5	1x
10mM “dNTP mixture” (Gibco-BRL)	1	0,2 mM cada
“iniciador 1” (Invitrogen)	—	50 pmol
“iniciador 2” (Invitrogen)	—	50 pmol
DNA molde	5	—
“Taq-DNA Polimerase (5U)” (Gibco-BRL)	0,25 U	2,5U
TOTAL	50	—

1.2.2. Pesquisa dos gene *stx1* e *stx2*

Os genes que codificam as toxinas Stx1 e Stx2 foram identificados através da técnica de PCR, descrita por BLANCO et al., 1996c, cujos iniciadores estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 4: Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para pesquisa dos genes *stx*.

Fator de Virulência	Iniciadores	Temp.(°C)	Tam.(pb)
Stx1 A	CGT TGA ATG TCA TTC GCTCTG C	55	302
B	CGT GGT ATA GCT ACT GTC ACC		
Stx2 A	CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG	55	516
B	CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC		

2. Pesquisa de Fatores de Virulência

2.1. Pesquisa de citotoxinas e enterotoxinas

A pesquisa dos genes que codificam para as toxinas produzidas por amostras de *E. coli* a saber: CNF1, CNF2, LT-I, LT-II, STa, STb, EAST1 e enterohemolisina (Ehly) foi realizada através de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os seguintes iniciadores (OLSVIK & STROCKBINE, 1993; SCHULTSZ et al., 1994; SCHMIDT et al., 1995; BLANCO et al., 1996b; YAMAMOTO & NAKAZAWA, 1997; YAMAMOTO et al., 1997) descritas na Tabela 5:

Tabela 5: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para a pesquisa dos genes que codificam citotoxinas e enterotoxinas.

Fator de Virulência	Iniciadores	Temp.(°C)	Tam.(pb)
CNF-1 A B	GAA CTT ATT AAG GAT AGT CAT TAT TTA TAA CGC TG	46	543
CNF-2 A B	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CAT GTC TTG TAT ATC TA	46	543
LT1 A B	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	50	696
LT2 A B	AGA TAT AAT GAT GGA TAT GTA TC TAA CCC TCG AAA TAA ATC TC	52	300
Ehly A B	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A	57	1551
STa A B	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	55	147
STb A B	ATC GCA TTT CTT CTT GCA TC G GGC GCC AAA GCA TGC TCC	60	172
EAST1 A B	CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT	55	111

2.1.1. Pesquisa de Enterohemolisina (Ehly)

A pesquisa de hemolisina foi realizada conforme a técnica de BEUTIN et al., (1989).

Após serem cultivadas em "Tryptic Soy Broth" (TSB - Difco) por 18 horas a 37°C, 2µl do cultivo das amostras foram inoculados em placas de meio base para ágar sangue

(Difco), acrescido de CaCl_2 a 10mM e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, lavado três vezes em tampão de salina-fosfato (PBS pH 7,4). As placas foram incubadas por 3 horas a 37°C para a pesquisa de α -hemolisina e por 24 horas, sob a mesma temperatura, para a pesquisa de Ehly. Amostra do sorogrupo O157 cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Jorge Blanco Alvarez do Depto. de Microbiologia e Parasitologia, Universidade de Santiago de Compostela – Lugo – Espanha, foi utilizada como padrão positivo para Ehly.

2.2. Pesquisa de Adesinas

2.2.1. PCR

O teste de PCR para pesquisa do plasmídio “EPEC adherence factor” (EAF), do gene que codifica para o “bundle forming pilus” (BFP) e do gene que codifica para Saa foi realizado utilizando-se a técnica anteriormente descrita no item 2.1, mudando-se apenas os iniciadores utilizados, bem como as quantidades de reagentes (FRANKE et al., 1994; GUNZBURG et al., 1995; JENKINS et al., 2003). Os iniciadores utilizados, assim como as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 6: Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para pesquisa de adesinas BFP e Saa e do plasmídio EAF.

Fator de Virulência		Iniciadores	Temp. (°C)	Tam.(pb)
BFP	A	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	63	326
	B	GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA		
EAF	A	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A	55	397
	B	TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA		
Saa	F	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC	63	119
	R	ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC		

2.2.2. Teste de adesão a células HEp-2

Aderência às células HEp-2

As provas de aderência às células de linhagem contínua foram realizadas em células HEp-2 (carcinoma de laringe humana, ATCC: CCL23).

2.2.2.1. Preparo das Amostras Bacterianas

Na infecção das culturas, as amostras a serem testadas foram cultivadas por 18 horas a 37°C em 3 ml de TSB (Tryptic Soy Broth – Difco).

2.2.2.2. Preparo das células HEp-2

A metodologia utilizada foi a atualmente adotada pela UNIFESP (Escola Paulista de Medicina), com algumas modificações. As células foram cultivadas em microplacas (Falcon, USA) com 24 câmaras em atmosfera de CO₂, contendo 1 ml de meio Eagle (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (na concentração de 10.000U/ml de penicilina e 10.000µg de estreptomicina). As estas microplacas previamente foram colocadas laminulas de 10x7mm estéreis em cada câmara. O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24-48 horas em microscópio invertido.

A cultura era considerada ideal para o teste quando as células apresentavam 50% ou mais da área da laminula recoberta e se apresentavam com baixa refração, sem deslocamento.

2.2.2.3. Teste de Adesão

O meio Eagle contido nas câmaras das microplacas foi retirado com o auxílio de micropipetas de 1000µl com ponteiros estéreis. As células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 – 0,01M estéril por 3 vezes para que todos os resíduos de soro fetal bovino e antibióticos fossem retirados. A cada orifício foram adicionados 1 ml de meio Eagle acrescido de 1% de D-manose (Difco), inoculando-se em seguida 40µl dos cultivos das amostras a serem testadas. Todas as amostradas foram examinadas em duplicata.

As microplacas contendo as amostras foram incubadas por 3 horas a 37°C e em seguida foram novamente lavadas com o mesmo tampão por 10 vezes para remover as bactérias que não aderiram. Após esta lavagem as laminulas foram fixadas pela adição de 1 ml de metanol P.A. por câmara, à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida coradas com May-Grunwald a 10% por 5 minutos e Giemsa a 5% por 20 minutos.

A presença ou não de aderência e o tipo de aderência quando presente foi observado em microscópio ótico, inicialmente com um aumento de 320x e em seguida sob objetiva de imersão. Os critérios para definição do tipo de adesão foram os descritos por CRAVIOTO et al., 1979.

Amostras controle para cada tipo de adesão, assim como amostras controle negativo foram incluídas em todos os testes realizados.

2.2.2.4. Teste de Adesão com 6 horas de incubação

Realizou-se o teste com 6 horas para as células que apresentaram adesão do tipo não característica, assim como as que não apresentaram adesão com 3 horas de incubação. A metodologia assemelha-se à empregada com 3 horas, sendo que após o período de incubação de 3 horas, o meio de cultivo foi retirado, as câmaras foram lavadas por 3 vezes

com PBS estéril e meio Eagle acrescido de 2% de soro fetal bovino foi repostado no volume de 1 ml em cada câmara. Realizou-se nova incubação por 3 horas na temperatura de 37°C e em seguida utilizou-se a mesma metodologia do teste de 3 horas para fixar, corar e observar as células.

2.3. Pesquisa de intima

2.3.1. PCR para detecção dos genes que codificam os subtipos de intima

O método utilizado foi o mesmo anteriormente descrito, utilizando-se as condições descritas pelos autores e os seguintes iniciadores (BLANCO et al., 2004a) e descritos na Tabela 7:

Tabela 7: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos amplificados para pesquisa de subtipos de intiminas de *E. coli*.

Subtipo de intimina	Iniciadores	Temp. (°C)	Tam. (pb)
Intimina $\alpha 1$	AAAACCGCGGAGATGACTTC CACTCTTCGCATCTTGAGCT	60	820
Intimina $\alpha 2$	AGACCTTAGGTACATTAAGTAAGC TCCTGAGAAGAGGGTAATC	60	517
Intimina β	TAA GGA TTT TGG GAC CC TTT ATT TGC AGC CCC CCA T	64	830
Intimina $\beta 1$	CGCCACTTAATGCCAGCG CTTGATACACCTGATGACTGT	60	811
Intimina $\beta 2$	CCCGCCACTTAATCGCACGT CTTGATACACCTGATGACTGT	60	807
Intimina $\gamma 1$	AAAACCGCGGAGATGACTTC AGAACGCTGCTCACTAGATGTC	60	804
Intimina $\gamma 2/\theta$	AAAACCGCGGAGATGACTTC CTGATATTTTATCAGCTTCA	58	808
Intimina δ/κ	AAAACCGCGGAGATGACTTC CTTGATACACCCGATGGTAAC	60	833
Intimina ε	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC AGC TCA CTC GTA GAT GAC GGC AAG CG	66	722
Intimina ζ	GAC TAC TTC TTA TCT GGA TTT TAA CTT GAC CAG TGG AAT CC	62	206
Intimina η	AAAACCGCGGAGATGACTTC TAGATGACGGTAAGCGAC	62	712
Intimina ι	AAAACCGCGGAGATGACTTC TTTATCCTGCTCCGTTTGCT	66	807
Intimina λ	CGGTCAGCCTGTGAAGGGC ATAGATGCCTCTTCCGGTATT	64	466
Intimina μ	CAACGGTAAGTCTCAGACAC CATAATAAGCTTTTGGCCTACC	64	433
Intimina ν	CACAGCTTACAATTGATAACA CTCACTATAAGTCATACGACT	60	311
Intimina ξ	AAA ACC GCG GAG ATG ACT TC ACC ACC TTT AGC AGT CAA TTT G	66	468

2.3.2. Western blot para detecção de intimina.

As amostras bacterianas foram semeadas em 5 ml de MEM (Meio Mínimo Essencial - Nutricel) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino. Incubou-se a 37°C por 18 horas, sem agitação. Centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 r.p.m. e desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 300µl de tampão de amostra (SDS -4g, Glicerol -20ml, tampão TRIS-HCl 0,5M pH6,8 -40ml, azul de bromofenol -0,1g, 2mercaptoetanol -5ml, H₂O destilada q.s.p. -100ml). Seguiu-se uma corrida eletroforética dessas amostras, em gel de poliacrilamida a uma concentração de 8%, submetido a uma corrente de 100v. Após a corrida eletroforética, retirou-se o gel e este foi montado em uma cuba de transferência (Permatron), onde o gel permaneceu voltado para o polo negativo e um filtro de nitrocelulose voltado para o polo positivo, de modo que as proteínas migrassem para o filtro de nitrocelulose (HybondTM-Amersham LIFE SCIENCE). Seguiu-se a transferência por 22 horas, sendo o material submetido a corrente de 30v. Após este período, retirou-se o filtro de nitrocelulose e corou-se com Ponceau S (Ponceau S -0,5g, ácido acético glacial -1ml, H₂O destilada q.s.p. -100ml) por 5 minutos. Lavou-se com H₂O destilada para a constatação da transferência. Bloqueou-se a reação com PBS 0,01M pH 7,4+ 0,1% de Triton X 100+ 4% de Leite desnatado (Solução Bloqueadora) por 1 hora. Após o bloqueio, o soro anti-intimina diluído 1:1000 na solução bloqueadora foi vertido sobre o filtro de nitrocelulose por 1 hora. Tratou-se com anti-IgG de coelho marcada com peroxidase (Horseradish Peroxidase Conjugated Goat - Anti Rabbit IgG - SIGMA) diluída 1:1000 em solução bloqueadora e então lavou-se duas vezes por 20 minutos cada com solução bloqueadora. A reação completou-se com três lavagens de 20 minutos cada. Para a primeira lavagem utilizou-se solução de PBS+Triton X 100 0,5%. As duas lavagens seguintes foram feitas com solução de TRIS-HCl 0,05M pH7,4. Para a visualização do resultado utilizou-se 1 comprimido de DAB (DAB Peroxidase Tablet Set - SIGMA FASTTM - 3'3'-Diaminobenzidina).(TOWBIN et al., 1979).

2.4. Fluorescence actin staining test (FAS Test)

Este foi utilizado para detectar a polimerização da actina sob os locais onde a bactéria se aderiu (SHARIFF et al., 1993).

O teste foi realizado com cultivos das amostras em meio TSB, incubados a 37°C por 18 horas. A monocamada celular resultante de 48 horas de crescimento em microplacas de 24 câmaras contendo lamínulas foi lavada 3 vezes com tampão PBS para retirada dos antibióticos. Em cada câmara adicionou-se 1 ml de M.E.M., suplementado com soro fetal bovino a 2% e 1% de D-Manose. Em seguida cada amostra teste crescida em TSB foi adicionada, na quantidade de 35µl, sendo uma amostra por câmara. Incubou-se a placa por 3 horas a 37°C em estufa de CO₂. A mesma foi lavada por 2 vezes com tampão PBS estéril e novamente foi adicionado 1 ml de MEM suplementado com soro fetal bovino a 2% e D-Manose a 1%. Retornou-se a placa para a estufa de CO₂ a 37°C por mais 3 horas. Em seguida realizou-se a fixação, retirando-se o MEM, lavando-se a placa 3 vezes com tampão

PBS e adicionando-se a cada câmara 1 ml de formalina (PBS - 100ml + Formaldeído 37% - 8ml). Deixou-se por 30 minutos. As células foram novamente lavadas por 3 vezes com tampão PBS, permeabilizadas com 1 ml de Triton X-100 (SIGMA) diluído a 1% em tampão PBS, por 4 minutos a temperatura ambiente e tratadas com 10µl de uma solução de 5µg/ml de PHALLOIDIN - FITC Labeled (SIGMA) por 30 minutos, a temperatura ambiente, em câmara escura. Seguiu-se a observação das células em microscópio de contraste de fase e fluorescência, sob imersão (Microscópio Nikon E200).

2.5. Sorogrupagem e Sorotipagem

A sorogrupagem das amostras foi realizada com os anti-soros O1 até O181, segundo metodologia de GUINÉE et al. (1972, 1981), com algumas modificações feitas por BLANCO et al., (1992b, 1996a). Foram utilizados 173 anti-soros Os capazes de reagir especificamente com os antígenos O1 a O181. Os soros foram obtidos no Laboratório de Referência de *Escherichia coli* (LREC). Os 173 anti-soros monovalentes se dividiram em 25 anti-soros polivalentes formados por 6 ou 7 anti-soros monovalentes. A diluição final dos anti-soros foi de 1/40 ou 1/80.

As amostras foram cultivadas em ágar TSA, por 18 horas a 37°C, ressuspensas em 1ml de solução de 0,85% de NaCl e a concentração bacteriana foi ajustada para $1,8 \times 10^9$ bactérias por ml, por comparação com o tubo número 6 da escala de Mc Farland. Este passo foi realizado em duplicata. Os tubos foram aquecidos a 100°C por 1 hora para inativar os antígenos K e por 2,5h a 121°C para testes com anti-soros preparados contra os antígenos O8, O9, O20 e O101, para inativação do antígeno K do tipo A. Estes antígenos recobrem o antígeno O e impedem sua reação com o anti-soro. Uma vez frio, adicionou-se a cada tubo, 2ml de solução de salina formalinizada (0,5%, v/v), contendo violeta de genciana (0,005%, p/v). Conservaram-se as suspensões bacterianas a 4°C durante um máximo de 2 semanas.

Os anti-soros O foram titulados com as amostras controle para escolher a diluição de ensaio, utilizando-se placas de microtitulação de 96 câmaras de fundo em "V".

As suspensões aquecidas a 100°C por 1 hora foram testadas com os 25 anti-soros polivalentes e as tratadas a 121°C por 2,5 horas foram testadas com soros monovalentes O8, O9, O20 e O101. Adicionaram-se 50µl de cada anti-soro a 50µl de cada suspensão bacteriana. Deixou-se incubar a 37°C por 18 horas. Se a cepa bacteriana aglutinasse com os anti-soros polivalentes empregados, realizava-se a continuação do processo com os anti-soros monovalentes daquele grupo. Se a cepa fosse negativa com todos os anti-soros, era considerada não tipável (ONT).

A determinação do antígeno H foi realizada utilizando-se 53 anti-soros (H1 a H56) que foram adquiridos no Statens Serum Institut, em Copenhagen.

As amostras foram passadas três vezes consecutivas (por 48 horas a 37°C) em tubos em "U" com meio para motilidade (Meio semi-sólido MIL, Difco) com o objetivo de potencializar a expressão dos flagelos. Se a cepa fosse móvel, dava-se continuidade ao

processo. Caso contrário, eram passadas mais 3 vezes consecutivas em tubos em “U”. Se continuassem imóveis, eram consideradas H⁻.

As amostras foram então semeadas em 7 ml de infusão de cérebro-coração (Difco) e incubadas por 6 a 8 horas a 37°C com 80 rpm. Adicionou-se 7 ml de solução salina formalinizada sem violeta de genciana e os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 18 horas. A turbidez dos tubos tratados com solução salina deveria ser comparável a do tubo nº 2 da escala de Mc Farland.

Em tubos de vidro foram misturados 0,5ml da suspensão bacteriana formalinizada e 0,5ml do anti-soro H diluído a 1/200. Incubou-se a 45°C por 2 horas em banho-maria. Realizou-se este processo com cada um dos anti-soros H monovalentes.

A aglutinação com algum dos anti-soros estabeleceu o antígeno H. As amostras onde não ocorreu aglutinação foram consideradas não tipáveis (HNT).

A sorologia foi gentilmente realizada pelo Prof. Dr. Jorge Blanco Alvarez do Depto. de Microbiologia e Parasitologia, Universidade de Santiago de Compostela – Lugo – Espanha.

2.6. Pesquisa do Local de Inserção de LEE

As amostras positivas para o gene *eae* foram submetidas a testes de PCR para determinar o local de inserção de LEE, seguindo-se a metodologia anteriormente descrita, utilizando-se os iniciadores descritos por McDANIEL et al., 1995 e SPERANDIO et al., 1998, indicados na Tabela 8.

Tabela 8: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados, nos testes de PCR para pesquisa do local de inserção de LEE em *E. coli*.

Inserção	Iniciadores	Temp. de Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Inserção na junção direita de <i>selC</i>	K255 – GGT TGA GTC GAT TGA TCT CTG G K261 – CCT GCA AAT AAA CAC GGC GCA T	60	418
Amplificação de <i>selC</i> intacto	K260-GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT K261- CCT GCA AAT AAA CAC GGC GCA T	60	527
Amplificação de <i>pheU</i> intacto	K913 – CAT CGG CTG GCG GAA GAT AT K914 – CGC TTA AAT CGT GGC GTC	52	300

2.7. Pesquisa de amostras STEC do sorogrupo O157 através no método de SIM (Separação Imuno-Magnética)

Foram selecionadas 50 amostras fecais isoladas de bezerros, com resultados positivos em testes de PCR para detecção dos genes *stx1* ou *stx2* e 50 amostras de carne bovina crua coletadas em açougues na cidade de São Paulo. As amostras fecais foram inoculadas em meio TSB e incubadas por 18 h a 37°C. As amostras de carne foram pesadas e 25g de cada amostra foram inoculados em 225ml de água peptonada Difco (suplementada com 8mg/ml de vancomicina, 0,05mg/l de cefixima e 10mg/l de cefsulodina (BPW-VCC) em embalagens plásticas estéreis. Estas embalagens foram processadas por 30 segundos em Stomacher (Laboratory Blender-Stomacher 400 – SEWARD) e incubadas por 6 horas a 37°C. As culturas, tanto de amostras fecais quanto de amostras de carne bovina, foram adicionadas em tubos tipo “eppendorf” no volume de 1ml, aos quais foram adicionados 20µl de partículas paramagnéticas (Dynabeadas® anti-*E. coli* O157). Os tubos foram colocados no “Sample Mixer” (Dyna® Sample Mixer), onde permaneceram por 30 minutos para que ocorresse a homogeneização das amostras com as partículas. Estes tubos foram então colocados no Separador Imuno Magnético (Dyna MPC-S), o qual foi invertido cerca de 4 a 5 vezes para que as partículas pudessem se aderir ao separador. Deixou-se em descanso por 3 minutos para o recolhimento propriamente dito e, em seguida, descartou-se o sobrenadante. Os tubos foram retirados do separador e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de PBS-Tween (0,05%). Repetiu-se este procedimento por 3 vezes. Ao final, o sedimento foi ressuspenso em 100µl de PBS-Tween, o qual foi semeado em ágar MacConkey Sorbitol e ágar MacConkey Sorbitol acrescido de Cefixima e Telurito (nas concentrações de 0,05mg/l e 2,5mg/l, respectivamente). As amostras fermentadoras de sorbitol foram isoladas e testadas em PCR para confirmação de *rfbO157* (PATON & PATON, 1998b). No caso de positividade, as amostras deveriam ser submetidas à confirmação dos antígenos O e H, através de sorologia, pelo Prof. Dr. Jorge Blanco Alvarez do Depto. de Microbiologia e Parasitologia, Universidade de Santiago de Compostela – Lugo – Espanha.

A metodologia utilizada no teste de PCR para detecção de *rfbO157* foi a mesma descrita anteriormente e os iniciadores utilizados, bem como a temperatura de anelamento, encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nos testes de PCR para detecção de *rfbO157* em *E. coli*.

GENE	Iniciadores	Temp.(°C)	Tam.(pb)
O157F	CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG	65	259
O157F	TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC		

2.8. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

O teste de RAPD consiste na amplificação, através de PCR, de fragmentos aleatórios de DNA genômico com um único iniciador ou múltiplos iniciadores de sequência conhecida. Esta técnica permite detectar o polimorfismo entre as amostras pelas diferenças entre os padrões dos fragmentos de DNA amplificados na corrida eletroforética do gel. O RAPD requer mínimas quantidades de DNA genômico e tem a vantagem de nenhuma informação do genoma bacteriano estudado ser necessária.

Para este teste foram escolhidas apenas 11 amostras do sorogrupo O111, sendo uma classificada como O111:H19 e as dez restantes como O111:H-, estes últimos reconhecidamente pertencentes aos grupos das EHEC e também, por terem sido encontradas em maior número em nosso estudo.

A extração do DNA foi realizada segundo metodologia fornecida pela Promega para o "Kit Wizard® Genomic DNA Purification". O DNA foi quantificado através da eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% com auxílio do "Kit DNA Quantitation Standards Phage λ DNA" (Gibco BRL) e corado com brometo de etídio. Após esta quantificação as amostras foram diluídas para 5ng/ μ l em água Milli-Q estéril, aliqüotadas e estocadas a -20°C.

A reação de amplificação foi realizada em tubos de 200 μ l no volume final de 20 μ l, contendo 20mM Tris-HCl (pH 8,4); 50mMKCl; 2,5mM MgCl₂; 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,4M de iniciador (Operon); 10ng de DNA cromossômico; 1,5 unidades de Taq polimerase. O ciclo térmico foi 40 vezes nas seguintes temperaturas: 94°C por 45 segundos, 36°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos e por último, um ciclo de 72°C por 7 minutos, para uma completa extensão dos produtos amplificados (BANDO et al., 1998).

Para a detecção do produto amplificado foi utilizada eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão Tris Borato (TBE 5X – TRIS Base - 54g, ácido bórico - 27,5g, EDTA 0,5M pH8,0 - 20ml, H₂O destilada - 1000ml). Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular, para comparação com os fragmentos amplificados. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) foram fotodocumentados.

Para a análise estatística dos fragmentos amplificados foi usado o Programa NTSYS, no qual utilizamos o índice de Jaccard para gerar uma matriz de similaridade e, a partir desta, foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA), que foi representado na forma de dendrograma.

Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Iniciadores utilizados no teste de RAPD.

Iniciadores	Seqüências
OPR-03	ACA CAG AGG G
OPR-06	GTC TAC GGC A
OPR-08	CCC GTT GCC T
OPR-10	CCA TTC CCC A

2.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Este teste foi realizado pelo Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini, no Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP.

O objetivo do estudo foi a observação das lesões do tipo A/E em células HEp-2 infectadas por amostras de *E. coli* portadoras do gene *eae*. Por ser um teste de difícil execução, apenas uma amostra *eae*⁺ e FAS⁺ foi examinada pelo mesmo.

Uma garrafa plástica de cultura de tecido de 6ml de volume foi cultivada com células HEp-2 em meio D-MEM, acrescido de 10% de SFB, 1% de antibióticos e 1% D-manose, até atingir confluência da monocamada celular. Após este período foi lavado três vezes com tampão PBS, adicionando-se novo meio de cultura, desta vez sem antibiótico, para possibilitar o cultivo da amostra teste.

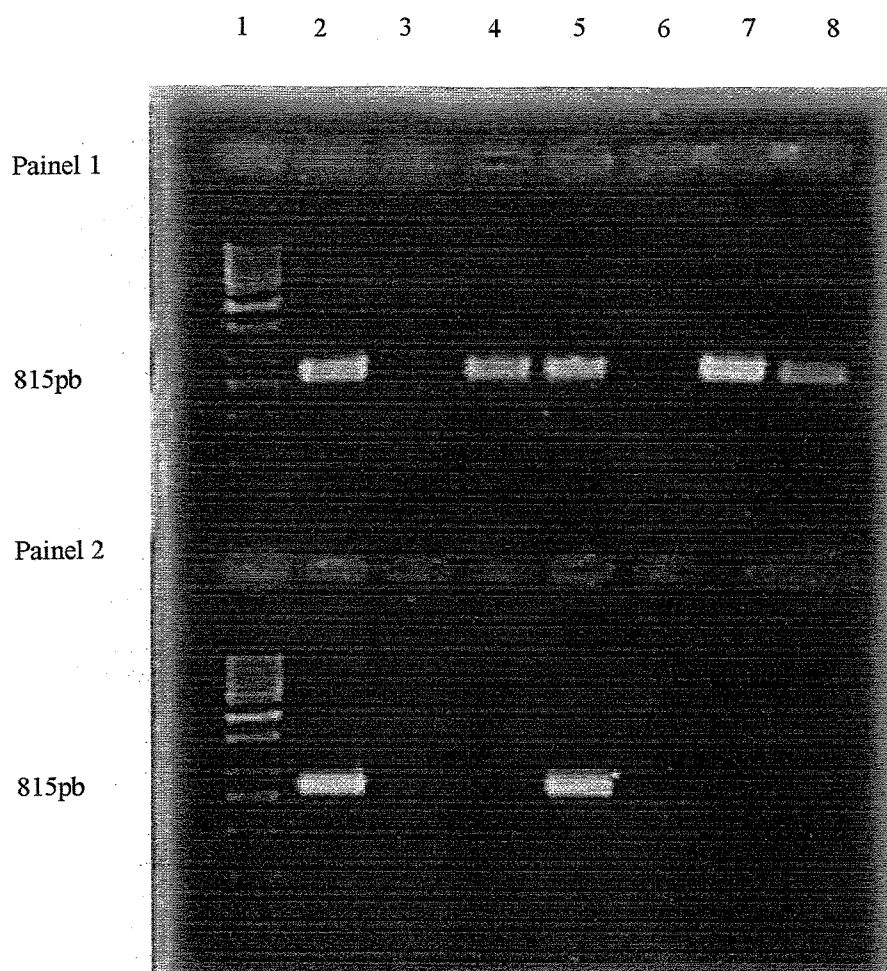
Foram acrescentados 175µl do inóculo bacteriano, consistindo de cultura bacteriana incubada por 18 horas a 37°C em meio TSB. A garrafa foi em seguida incubada por 6 horas a 37°C. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e fixadas com glutaraldeído a 2,0% em tampão fosfato, por um período de 2 horas. A monocamada, em seqüência, foi raspada e centrifugada a 3400 r.p.m., durante 5 minutos, ressuspensão em salina e centrifugado por mais duas vezes. Seguiu-se o contraste com solução de ósmio a 1% durante 24 horas, com séries de lavagens como descrito anteriormente. Acrescentou-se acetato de uranila a 0,5% por 24 horas e após lavagem deste, procedeu-se a inclusão em ágar. Adicionou-se uranila a 0,5%, prosseguindo-se com a desidratação e inclusão do material em resina para realização de cortes semifinos e ultrafinos de 50 a 70µm, em navalha de vidro acoplada em ultramicrotomo MT 5000 Sorval. Os cortes assim obtidos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 201.

IX - RESULTADOS

Obtivemos 98 amostras de *E. coli* isoladas de 68 diferentes espécimes fecais, sendo 34 espécimes fecais coletados de animais diarréicos e 34 de animais saudáveis.

I. Pesquisa do gene eae

Obtivemos um total de 48 isolados de *E. coli eae* positivos, de 32 diferentes amostras fecais. Destes, 15 animais apresentavam diarréia e 17 estavam sadios. Isto representa um total de 49% das amostras de *E. coli* isoladas. Entre os animais diarréicos, obtivemos 5,7% de isolamento de amostras de *E. coli* portadoras do gene *eae* e entre os animais sadios obtivemos 6% de positividade para o mesmo gene (Figura 2 e Tabelas 12, 13, 14, 15 e 17).



Paine 1: 1 (1KbDNA Ladder), 2 (E2348/69), 3 (K12C600), 4 (128MB5), 5 (Beleza 3), 6 (132MB9), 7 (034BG12) e 8 (18F19).

Paine 2: 1 (1KbDNA Ladder), 2 (E2348/69), 3 (K12C600), 4 (6CP8), 5 (N44 14), 6 (1FC1), 7 (21FC19) e 6 (19F5).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 1% com resultado do teste de PCR para detecção do gene *eae* que codifica intimina.

2. Pesquisa de subtipos de intiminas

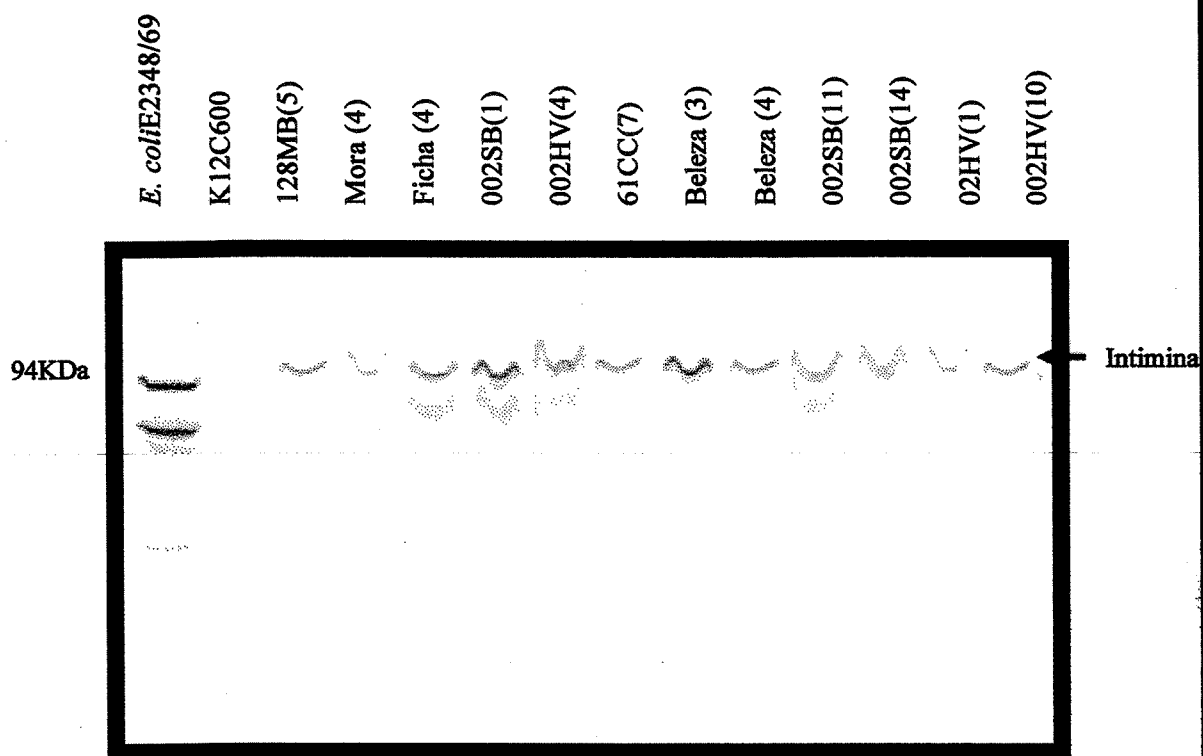
Das 48 amostras *eae* positivas isoladas, 17 amostras foram positivas para o subtipo β 1, 15 amostras para o subtipo γ 2, 3 amostras para o subtipo ϵ , 2 amostras para o subtipo ζ e 1 amostra foi positiva para o subtipo μ . As demais 10 amostras positivas para o *eae* não amplificaram com nenhum dos iniciadores utilizados para a determinação dos subtipos de intimina conhecidos, sendo consideradas como não tipáveis (NT), sugerindo assim a possível presença de um (ou vários) novo (s) subtipo (s) de intimina (s) em nossas amostras (Tabela 11).

Tabela 11: Subtipos de intimina e porcentagem de detecção por PCR em amostras de *E. coli eae+* isoladas de bezerros.

Tipo de intimina	Número de amostras positivas	Porcentagem (%)
Intimina Não Tipável	10	21
Intimina α	0	0
Intimina β1	17	35,4
Intimina γ2	15	31,2
Intimina δ	0	0
Intimina ϵ	3	6,2
Intimina ζ	2	4,2
Intimina μ	1	1

Das 19 amostras *eae+* testadas em Westen blot, 14 confirmaram a presença de intimina e 5 amostras foram negativas neste teste (Figura 3). Destas 14 amostras, 13 foram positivas também em testes de FAS e 1 amostra apresentou-se FAS negativa. Das 5 amostras negativas em Western blot, 3 tiveram resultado positivo em FAS e 2 foram negativas para ambos os testes (Vide Anexo 1).

Quando as amostras *eae+* foram testadas em FAS, 33 das 48 amostras apresentaram-se positivas neste teste. Cinco (5) amostras tiveram o FAS inviável devido ao fato de serem negativas em testes de adesão celular e 10 amostras apresentaram-se negativas para o teste de FAS (Vide Tabela 18 e Anexo 1).



Canaleta 1: *E. coli* E2348/69 (Padrão positivo para intimina), Canaleta 2: K12C600 (Padrão negativo para intimina), Canaletas 3-14: amostras teste *eae*+

Figura 3: Resultado do teste de Western blot para detecção de intimina.

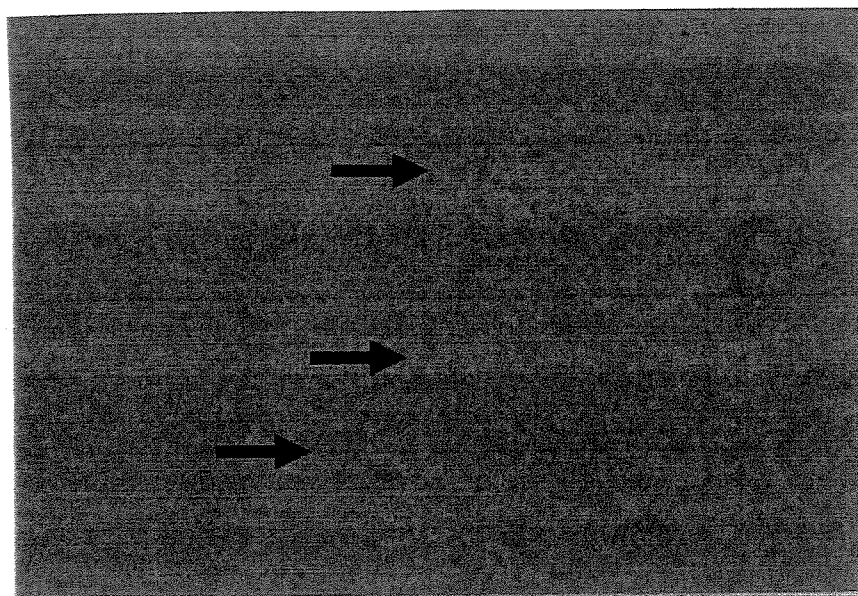


Figura 4: Resultado do teste de FAS para detecção de lesões A/E (contraste de fase) – Amostra *E. coli* 937BG(12) (O118:H16) (Aumento focal=1.000X).

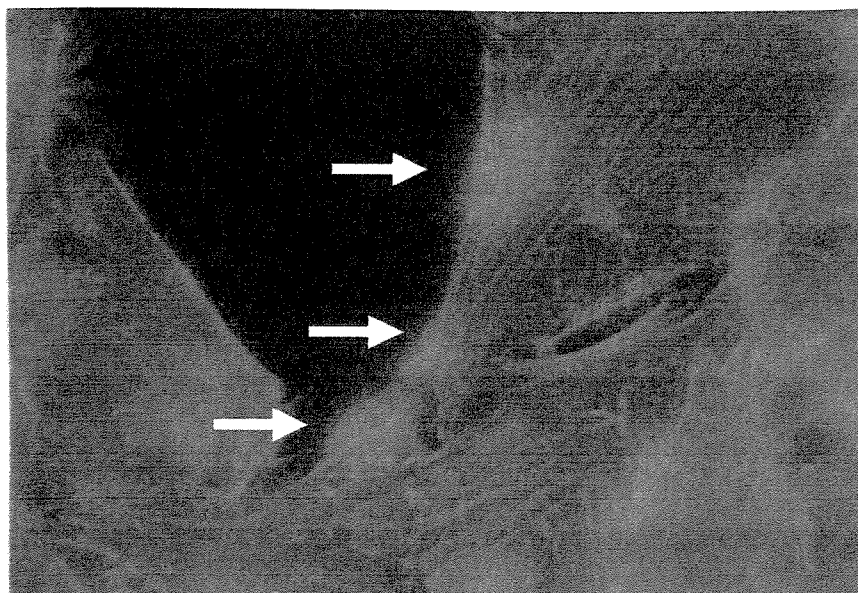


Figura 5: Resultado do teste de FAS para detecção de lesões A/E (Fluorescência) – Amostra *E. coli* 937BG(12) (O118:H16) (Aumento focal=1.000X).

3. Inserção de LEE

Das 48 amostras *eae*⁺ testadas em PCR quanto à inserção de LEE, 37 apresentaram *pheU* interrompido, indicando assim a provável presença de LEE neste locus. Oito (8) delas não apresentaram inserção de LEE em *selC* e apresentaram *pheU* intacto, indicando outro possível locus de inserção. Três (3) amostras não apresentaram bandas em *selC*, e apresentaram *pheU* intacto, enquanto 7 amostras apresentaram o mesmo fenômeno em *selC*, porém tiveram *pheU* interrompido.

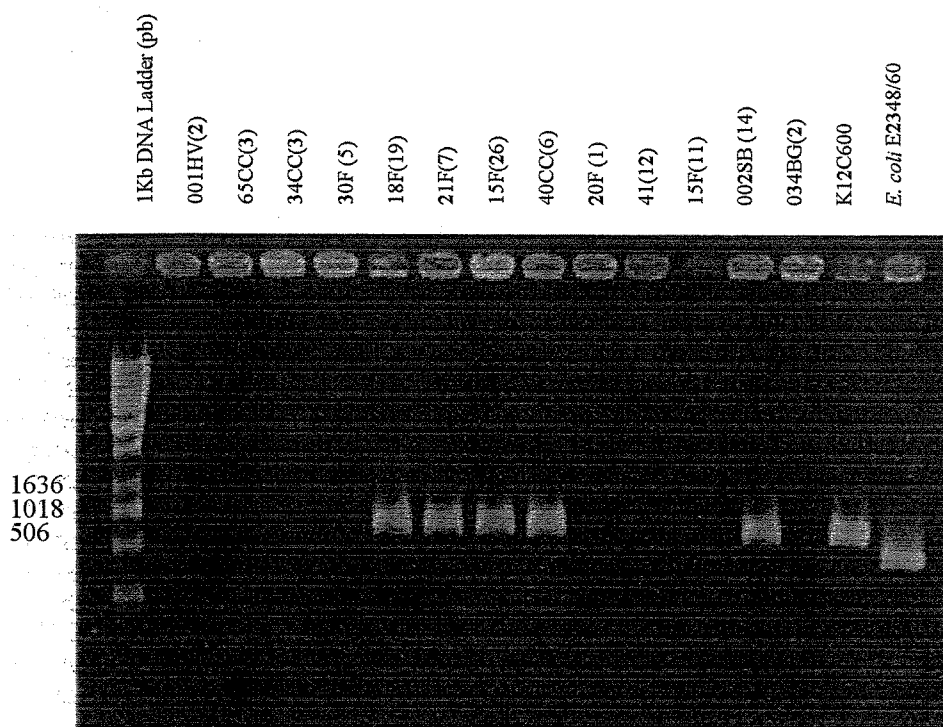


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 1% com resultado do teste de PCR para determinação do local de inserção de LEE.

4. Pesquisa de citotoxinas e enterotoxinas

Das 98 amostras de *E. coli* isoladas, 76 apresentaram-se positivas para o gene que codifica para a toxina Stx. Entre os 264 animais diarreicos estudados, 27 (10,2%) apresentaram-se positivos para *stx* e dentre os 282 animais sadios estudados, 22 (7,8%) apresentaram-se positivos para o mesmo gene. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 12 e 13 e Figura 7.

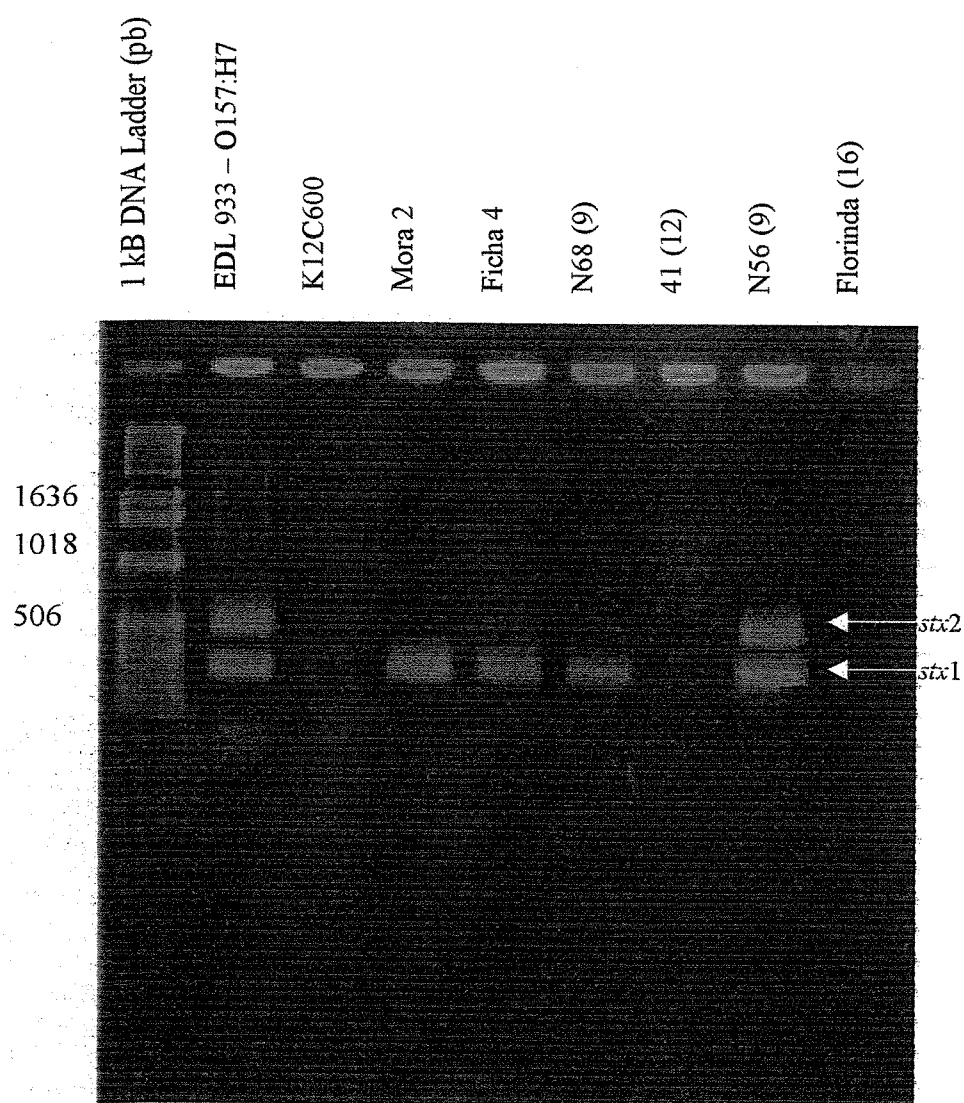


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% com amplificados por PCR dos genes para Stx1 e Stx2 de *Escherichia coli*.

Tabela 12: Relação de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de fezes de bovinos com diarreia, positivas para os genes *eae*, *stx* e *Ehly*.

Amostra	<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>Ehly</i>
128MB 5	+	1,2	+
128MB 6	-	1	-
Mora 1	-	1	-
Mora 2	+	1	+
Mora 5	-	1	-
Mora 8	+	1	+
Mora 17	+	1	-
Mora 4	+	1	+
937BG12	+	1	+
Elga 5	-	1	-
Elga 2	-	1	-
129MB2	+	1,2	+
129MB3	-	1,2	-
132MB9	-	1,2	+
102MB 9	-	1	-
102MB 11	-	1	-
92MB 4	-	1	-
92MB 5	-	1	-
92MB 6	-	1	-
92MB 7	-	1	-
92MB 9	-	1	-
151MB 3	-	2	-
151MB 13	-	1,2	-
002SB 1	+	1	+
002SB 11	+	1	+
002SB 14	+	1	+
001HV 2	+	1	+
001HV 5	+	1	-
002HV 4	+	1	+
002HV 1	+	1	+
002HV 10	+	1	+
002HV 5	+	1	+
43CC2	+	-	+
65CC 3	+	-	+
034BG 2	+	-	+
20F 1	+	-	+

Tabela 12: Continuação

Amostra	<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>Ekly</i>
9F 17	+	-	+
6CP 8	-	1	+
30F 5	+	-	+
21FC 19	-	2	-
9FB 17	-	2	-
10FB 19	-	1,2	-
16FB 12	-	1	-
9FG 9	-	1	-
1997 2	-	2	-
1978 8	-	1	-
2094 2	+	2	+
1993 1	-	1	+
2098 1	-	1	-
N62 14	-	1	+
N62 15	-	2	-
9FC 19	-	1,2	-
5FC 4	-	1,2	+
12FC1	-	1,2	+
20FG 1	+	-	-

Tabela 13: Relação de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de bovinos sem diarreia, positivas para os genes *eae*, *stx* e *Ehly*.

Amostra	<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>Ehly</i>
78CC 22	-	1,2	+
78CC 26	-	1,2	-
004HV 5	+	-	+
41CC5	+	-	-
36CC 1	+	-	+
36CC4	+	-	+
18F 19	+	-	-
Florinda19	+	-	-
Florinda16	+	-	+
15F 11	+	-	-
15F26	+	-	+
Ficha 1	+	1	+
Ficha 4	+	1	-
Ficha 5	+	1	+
Beleza 2	+	1	+
Beleza 3	+	1	+
Beleza4	+	1	+
61CC7	+	1	+
34CC 3	+	-	-
40CC 6	+	-	-
21F 7	+	-	+
14F 2	+	-	-
28CP 15	-	1,2	+
N61 12	-	1	+
N61 8	-	1,2	+
73CC 11	+	-	-
7J 15	-	1,2	+
Catita 8	-	2	-
1FC 1	-	1,2	+
3FC 4-	-	1,2	-
8FC 1	-	1,2	+
19FC 15	-	2	-
4FG 1	-	1	-
N70 4	-	1	-

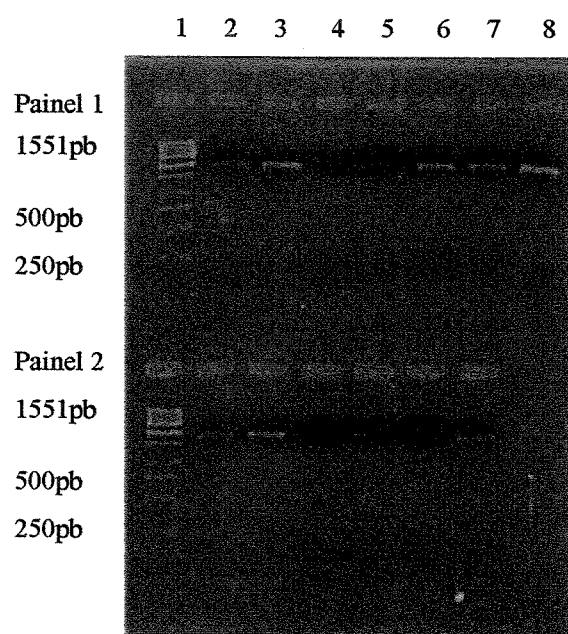
Tabela 13: Continuação

Amostra	<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>Ehly</i>
41 12	+	-	+
N68 9	-	1	-
Palestina (6)7	-	1,2	+
32 5	+	1	+
N46 7	-	1,2	+
16 5	-	1,2	+
N44 14	+	2	+
N56 9	-	1,2	+
2089 8	-	2	-

Obteve-se amplificação do gene que codifica para a toxina CNF em 11 amostras, isoladas de nove espécimes fecais de bezerros, o que significa um percentual de 2,1%. Nos animais diarreicos foi possível identificar *E. coli* com o gene que codifica CNF em 5 espécimes fecais (1,9%) e nos animais saudáveis em quatro espécimes fecais (1,4%).

Obteve-se ainda o isolamento de uma única amostra portadora do gene que codifica para a toxina LT-II. Esta mesma amostra era portadora ainda do gene que codifica para Stx1.

Conseguiu-se ainda o isolamento de 54 amostras positivas em PCR para o gene que codifica a enterohemolisina (*Ehly*) (Figura 8), isoladas de 42 animais, representando 7,7% de positividade. Dentre os 264 animais diarreicos, 20 (7,6%) foram positivos para este gene, e entre os animais sadios, 22 (7,8%) foram positivos. Das 54 amostras de *E. coli* *Ehly*+ isoladas, 14 (25,92%) delas abrigavam conjuntamente o gene *eae*, 23 (42,60%) abrigavam os genes *eae* e *stx* e 17 (31,50%) abrigavam o gene *stx*. A caracterização das linhagens de *E. coli* para genes que codificam as toxinas e enterotoxinas encontram-se nas Tabelas 12 e 13 (*stx*, *hly*) e 14 (*stx*, *hly*, *cnf* e *lt*). A Tabela 14 exibe ainda a correlação entre a presença dos genes de toxinas e o gene *eae*.



Painel 1: 1 (1Kb DNA Ladder), 2 (O157-157), 3 (*E. coli* O16:H11), 4 (K12 C600), 5 (Ficha 4), 6 (937BG 12), 7 (78CC 22), 8 (1FC 1).

Painel 2: (1Kb DNA Ladder), 2 (O157-157), 3 (*E. coli* O16:H11), 4 (K12 C600), 5 (9FB 17), 6 (N62 15), 7 (12FC 1).

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1% com amplificados por PCR do gene que codifica Ehly de *Escherichia coli*.

Tabela 14: Números e porcentagens (%) de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos positivas por PCR para diferentes fatores de virulência.

Fatores de virulência	Número de Amostras	Porcentagem (%)
<i>eae</i>	8	8,2
<i>eae/stx1</i>	3	3,1
<i>eae/Ehly</i>	14	14,3
<i>eae/Ehly/stx1</i>	19	19,4
<i>eae/Ehly/stx2</i>	2	2
<i>eae/Ehly/stx1/stx2</i>	2	2
<i>stx1</i>	9	9,2
<i>stx1/Ehly</i>	3	3,1
<i>stx1/LT-II</i>	1	1
<i>stx1/CNF</i>	9	9,2
<i>stx1/stx2/CNF/Ehly</i>	1	1
<i>stx1/stx2</i>	6	6,1
<i>Stx1/stx2/ Ehly</i>	12	12,2
<i>stx2</i>	8	8,2
<i>Stx1/CNF/ Ehly</i>	1	1

Todas as amostras foram testadas em ágar sangue para verificarmos a expressão da enterohemolisina. Das 54 amostras positivas em PCR para o gene *Ehly*, 52 expressaram a hemolisina. Nenhuma das 44 amostras negativas em PCR expressou a enterohemolisina e duas (2) amostras positivas em PCR não expressaram esta toxina.

Somente duas (2) amostras foram positivas em PCR para o gene que codifica EAST-1, a saber, amostras Ficha (5) e 151MB (13).

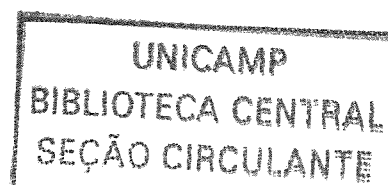


Tabela 15: Número de amostras de *E. coli* isoladas de bovinos com e sem diarreia, positivas para os genes *eae*, *stx* e *Ehly*, associados ou não.

Genes	Amostras Positivas	
	Animais com diarreia	Animais sem diarreia
<i>eae/stx1/stx2/Ehly</i>	2	0
<i>eae/stx1/Ehly</i>	12	7
<i>eae/stx2/Ehly</i>	1	1
<i>eae/stx1</i>	2	1
<i>eae/Ehly</i>	6	5
<i>eae</i>	1	10
<i>stx1</i>	15	3
<i>stx2</i>	5	3
<i>stx1/hly</i>	4	1
<i>stx1/stx2</i>	4	2
<i>stx1/stx2/hly</i>	3	10

5. Pesquisa de adesinas e do plasmídeo EAF

Das amostras de *E. coli* isoladas, nenhuma se apresentou positiva em testes de PCR para os genes *bfp* ou *eaf*. O gene *saa* foi encontrado em 22 amostras isoladas de 17 animais diferentes (Tabela 17). Destas amostras, 6 apresentaram conjuntamente os genes *stx1* e *cnf2* (27,27%), 5 apresentaram o gene *stx1* (22,73%), 4 apresentaram *stx1*, *stx2* (18,18%), 3 apresentaram *stx1*, *stx2* e *Ehly* (13,64%), 2 apresentaram *stx2* (9,09%), 1 apresentou *stx1* e *Ehly* (4,54%) e 1 apresentou *stx1*, *cnf2* e *Ehly* (4,54%).

Tabela 16: Relação de amostras positivas para o gene *saa*, detectado nos testes de PCR.

<i>saa</i> positivas	<i>stx</i>	<i>cnf</i>	<i>Ehly</i>	<i>saa</i> positivas	<i>stx</i>	<i>cnf</i>	<i>Ehly</i>
128MB 6	1	2	-	78CC 22	1 e 2	-	+
Mora 1	1	-	-	6CP 8	1	2	+
Elga 5	1	2	-	1FC 1	1 e 2	-	+
Elga 2	1	-	-	3FC 4	1 e 2	-	-
92MB 4	1	2	-	9FB 17	2	-	-
92MB 5	1	2	-	16FB 12	1	-	-
92MB 6	1	-	-	4FG 1	1	2	-
92MB 7	1	-	-	9FG 9	1	2	-
151MB 3	2	-	-	N46 7	1 e 2	-	-
151MB 13	1 e 2	-	-	N62 14	1	-	+
N56 9	1 e 2	-	+	9FC 19	1 e 2	-	-

Quando as 98 amostras isoladas foram testadas em células HEp-2, 25 amostras não apresentaram aderência. Entre as 73 amostras positivas, obtivemos 17 amostras com aderência do tipo Localizada-“like”, 14 amostras com aderência do tipo Agregativa, 10 amostras com aderência Difusa, 26 amostras com aderência do tipo Não característica, 1 amostra com aderência do tipo “Cover-slip”, 5 amostras que descolaram a monocamada celular impossibilitando, neste caso, a leitura do teste (Tabelas 17 e 18 e Figuras 9 a 12).

Tabela 17: Correlação entre tipo de aderência e presença do gene *eae* entre as amostras isoladas.

Tipo de Adesão	Número de Amostras	Porcentagem (%)
Aderência Difusa+ <i>eae</i> +	4	4,1
Aderência Difusa+ <i>eae</i> -	6	6,1
Aderência Agregativa+ <i>eae</i> +	8	8,2
Aderência Agregativa+ <i>eae</i> -	6	6,1
Aderência Localizada-like+ <i>eae</i> +	17	17,3
Aderência Não-Característica+ <i>eae</i> +	14	14,3
Aderência Não-Característica+ <i>eae</i> -	12	12,2
Aderência Negativa- <i>eae</i> +	5	5,1
Aderência Negativa- <i>eae</i> -	20	20,4
Aderência do Tipo Cover Slip- <i>eae</i> -	1	1
Descolamento de Tapete- <i>eae</i> -	5	5,1

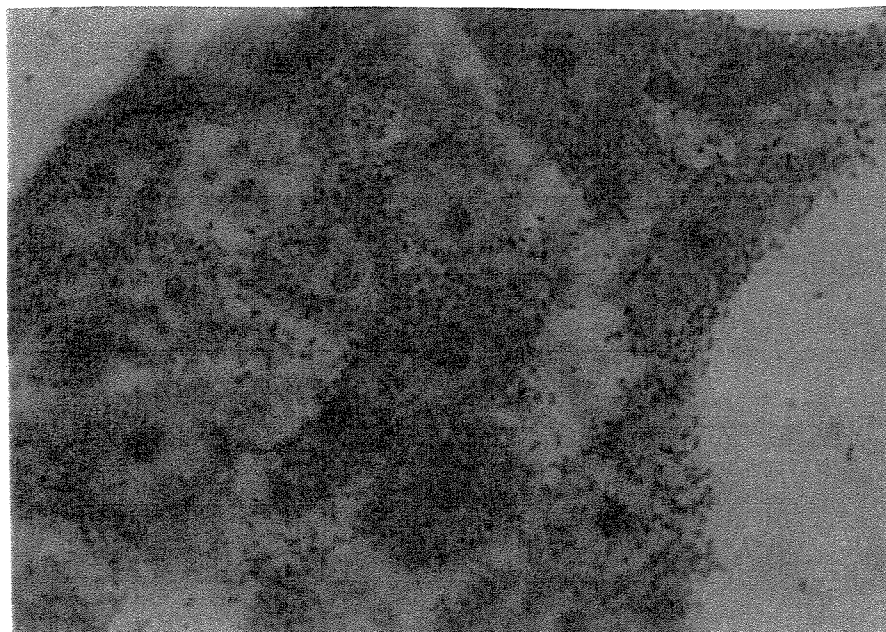


Figura 9: Linhagem celular HEp-2 inoculada com *E. coli* de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência difusa – Amostra *E. coli* Ficha (4).

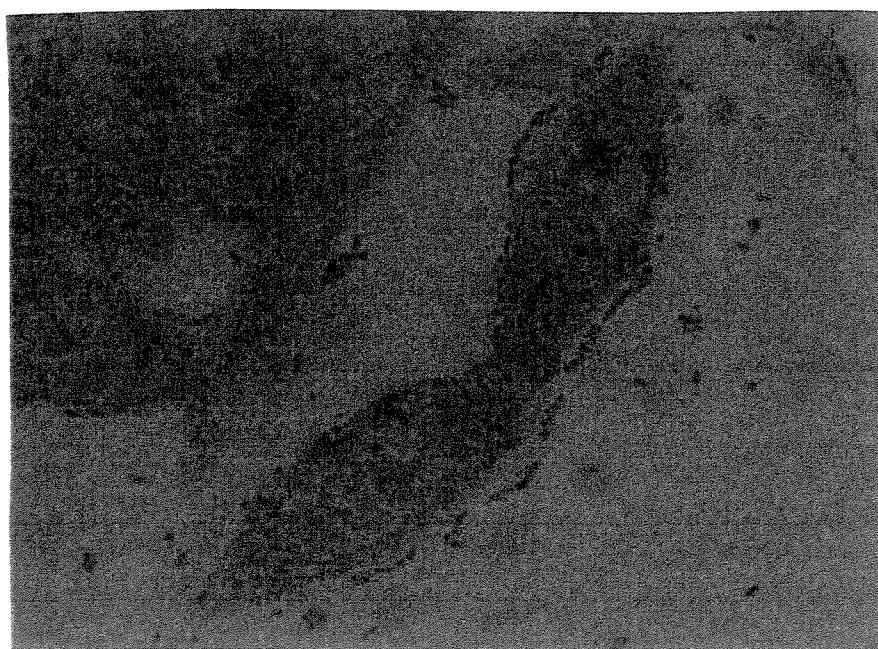


Figura 10: Linhagem celular HEp-2 inoculada com *E. coli* de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência Agregativa – Amostra *E. coli* 15F(11).



Figura 11: Linhagem celular HEp-2 inoculada com *E. coli* de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência “Localizada-like” – Amostra *E. coli* 937BG(12).



Figura 12: Linhagem celular HEp-2 inoculada com *E. coli* de origem bovina, 6 horas de incubação. Setas indicam aderência Não Característica – Amostra *E. coli* 61CC(7).

Tabela 18: Tipo de adesão e presença do gene *eae* e lesões A/E em amostras de *E. coli* isoladas de bovinos.

Tipo de Adesão	Presença do gene <i>eae</i> e lesões A/E	Número de Amostras
Aderência Localizada-like	<i>eae</i> + FAS+	15
Aderência Localizada-like	<i>eae</i> + FAS-	2
Aderência Difusa	<i>eae</i> + FAS+	2
Aderência Difusa	<i>eae</i> + FAS-	2
Aderência Difusa	<i>eae</i> - FAS inviável•	5
Aderência Agregativa	<i>eae</i> + FAS+	5
Aderência Agregativa	<i>eae</i> + FAS-	3
Aderência Agregativa	<i>eae</i> - FAS inviável•	7
Aderência Não Característica	<i>eae</i> + FAS+	11
Aderência Não Característica	<i>eae</i> + FAS-	3
Aderência Não Característica	<i>eae</i> - FAS inviável•	12
Aderência do tipo “Cover Slip”	<i>eae</i> - FAS inviável•	1
Lise do Tapete Celular	<i>eae</i> - FAS inviável••	5
Aderência Negativa	<i>eae</i> + FAS inviável••	5
Aderência Negativa	<i>eae</i> - FAS inviável•	20

• Amostras *eae* negativas normalmente impossibilitam o teste de FAS, pois este teste detecta modificações celulares devidas a proteína intimina e o Sistema de Secreção Tipo III, codificado pelo locus LEE.

•• Amostras com aderência negativa e que provocaram lise no tapete celular impossibilitam a realização do teste de FAS, pois a aderência é o passo inicial para a realização deste teste.

6. Separação Imuno-Magnética

Nenhuma das 50 amostras fecais ou das 50 amostras de carne bovina crua testadas para a presença de O157 tiveram resultados positivos para este sorogrupo.

7. RAPD – O resultado da tipagem molecular por RAPD é apresentado na Figura 13.

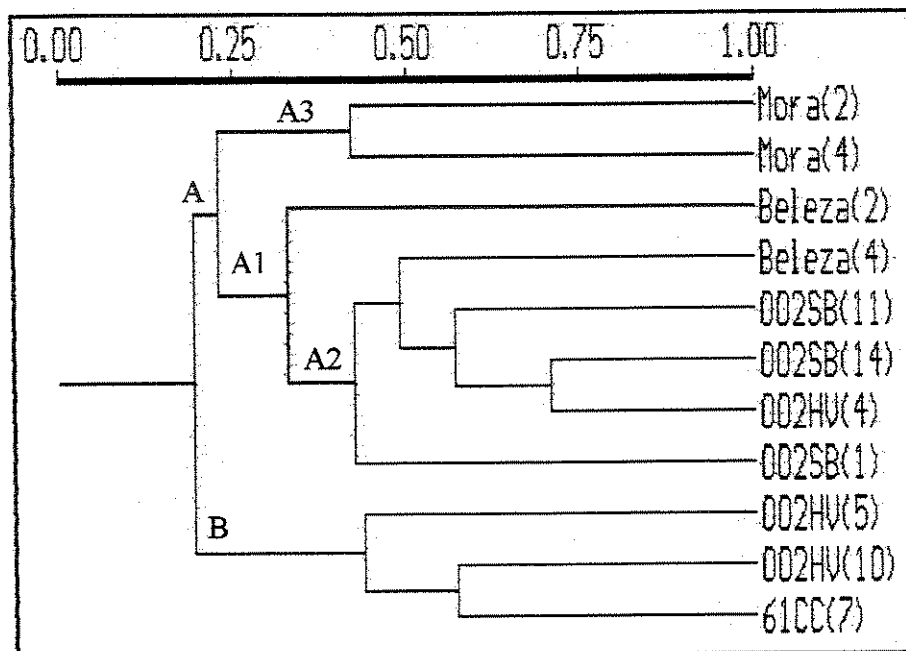


Figura 13: Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos “UPGMA” para o coeficiente de Jaccard para as 11 amostras de *E. coli* do sorogrupo O111, obtidos pela técnica RAPD.

8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

A amostra 937BG12 apresentou-se positiva neste teste, e foi escolhida por apresentar-se também positiva em PCR para o gene *eae* e ter resultado positivo no teste de FAS, além de pertencer ao sorotipo O118:H16, já descrito em casos de SHU em humanos (WIELER et al., 2000).

9. Sorologia.

Os sorotipos encontrados entre nossas amostras encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19: Número de amostras isoladas de cada sorotipo encontrado:

Sorotipo	Número de amostras isoladas	Sorotipo	Número de amostras isoladas
O7:H7	1	O111:H19	1
O7:H10	3	O113:H21	1
O8:H21	1	O116:H20	1
O8:H25	1	O118:H16	1
O8:H?	1	O119:H-	6
O10:H51	1	O119:H8	1
O11:H-	2	O123:H7	1
O17:H18	1	O123:H2	3
O21:H25	1	O123:H11	5
O22:H11	2	O123:H36	2
O22:H16	4	O127:H40	1
O26:H11	4	O132:H51	3
O48:H7	1	O145:H-	1
O48:H-	1	O153:H12	1
O55:H19	1	O174:H21	3
O60:H19	1	O175:H40	1
O64:H-	1	O177:H11	4
O80:H26	1	O178:H19	2
O86:H36	1	O?:H?	4
O88:H8	1	O?:H25	1
O98:H49	1	ONT:H-	3
O103:H7	1	ONT:H8	2
O103:H21	1	ONT:H11	2
O111:H-	12	ONT:H18	1
O111:H8	2		

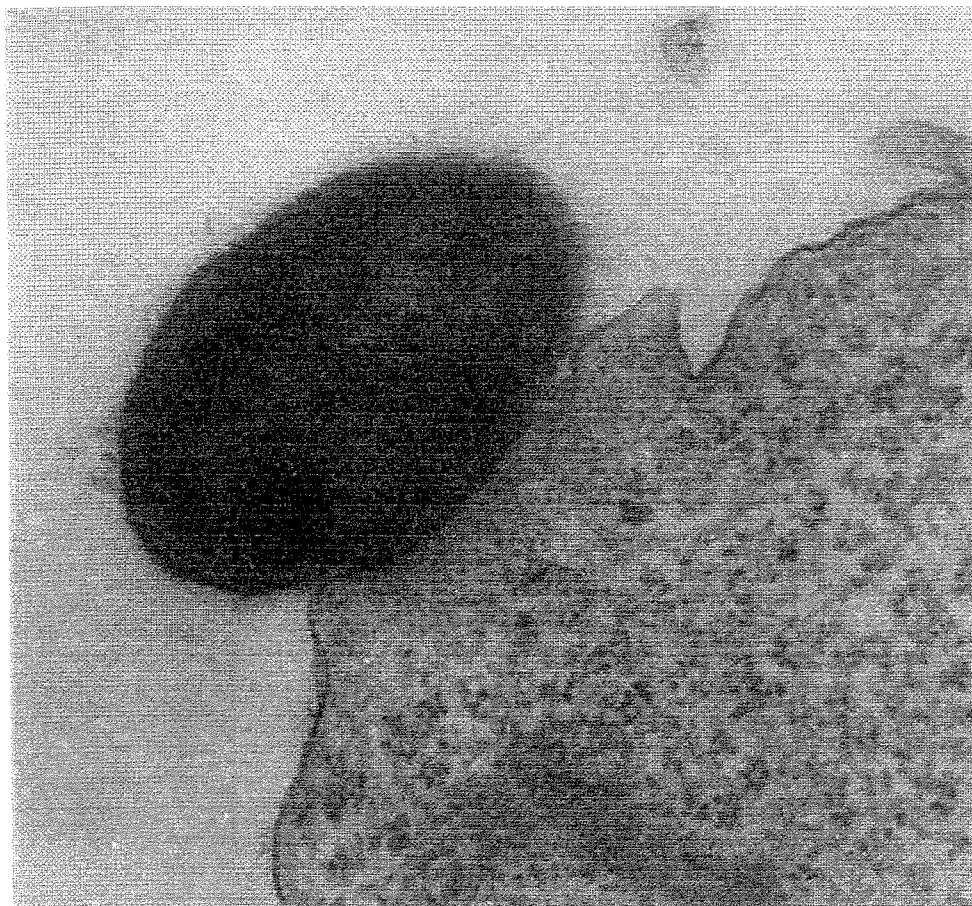


Figura 14: Resultado do teste de MET para demonstração de lesões A/E. Microfotografia da amostra 937BG (12) (O118:H16) – demonstrando a lesão “Attaching and Effacing” em células HEp-2 com incubação de 6 horas (aumento focal = 69.500X).

X - DISCUSSÃO

Amostras STEC têm sido associadas tanto a surtos como a casos esporádicos de doenças em humanos, podendo variar desde uma simples diarreia até casos de Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). O sorotipo de *E. coli* predominante nestes casos é o O157:H7, sendo comumente encontrado em grandes surtos nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido (PRADEL et al., 2000). A Argentina está entre os maiores recordistas de casos de SHU (300-400 casos por ano), numa razão de 22/100.000 crianças com idade inferior a 4 anos. Este número é bastante elevado quando comparado com a incidência anual de 2.6/100.000 em Oregon e 3 a 5/100.000 no Canadá, Reino Unido, Chile e Uruguai (PADOLA et al., 2002). Amostras pertencentes a mais de 100 diferentes sorotipos têm sido associadas com doença humana. Entre os sorogrupos STEC mais comumente associados com enfermidade em humanos podemos citar O26, O91, O103, O111, O113, O118 e O157 (PRADEL et al., 2000; GERBER et al., 2002).

A habilidade destas amostras em causar doenças está relacionada à produção das toxinas Stx1 e Stx2. Entre as amostras isoladas neste presente estudo, obtivemos um total de 14% (76 amostras isoladas de 49 diferentes animais) de amostras *stx* positivas, sendo que destas, 45 abrigavam *stx1* somente, 10 abrigavam *stx2* e 21 amostras possuíam ambos os genes. É interessante ressaltarmos que, como no caso das amostras 128MB5, 128MB6, as quais foram isoladas do mesmo animal, somente a amostra 128MB5 possuía o genótipo *stx1* e 2+*eae*+*Ehly*+, aderindo de forma localizada-like em células HEp-2 e provocando lesões A/E, confirmado por teste de FAS. A amostra 128MB6, apesar de pertencer ao mesmo sorotipo, possuía somente o gene *stx1* e o gene que codifica para a toxina CNF2, além de provocar descolamento do tapete celular, impossibilitando a leitura do teste de adesão.

Ainda entre as amostras STEC isoladas, 26 abrigavam o gene *eae*. Destas 26 amostras, 2 foram *eae*+*stx1*+*stx2*+, 2 amostras foram *eae*+*stx2*+ e o perfil *eae*+*stx1*+ foi o mais frequentemente encontrado em 22 amostras. Estes dados confirmam aqueles apresentados por WIELER et al. (1996), que também obtiveram um maior número de amostras produtoras de Stx1, portadoras do gene *eae*, isoladas de bezerras.

Outro importante achado encontrado em nosso trabalho foi a presença do gene que codifica para a enterohemolisina (*Ehly*) em 53 amostras, as quais apresentaram os genótipos *eae*+*stx1*+*stx2*+*Ehly*+ (2 amostras), *eae*+*stx1*+*Ehly*+ (19 amostras), *eae*+*stx2*+*Ehly*+ (2 amostras), *eae*+*Ehly*+ (13 amostras), *stx1*+*stx2*+*Ehly*+ (13 amostras) e *stx1*+*Ehly*+ (4 amostras). Este fato chama a atenção, pois as amostras portadoras dos genes *eae*+*stx*+*Ehly*+ ou *stx*+*Ehly*+ possuem genótipo potencialmente compatível com EHEC, principalmente os isolados pertencentes aos sorotipos O111:H

e O118:H16, que já foram descritos como EHEC em outros países (WIELER et al., 1998; PRADEL et al., 2000).

Até onde sabemos, este é o primeiro relato do isolamento de amostras de sorotipos potencialmente capazes de causar CH e SHU em humanos, possuindo os genes de virulência *eae* e *stx*, em fezes de bezerros no Brasil.

Em nosso país temos a confirmação do isolamento de amostras STEC O157:H7 em associação com doença em humanos, descrito por IRINO et al., (2002), um (1) caso de SHU relacionado ao sorotipo STEC O26:H11, identificado recentemente por GUTH et al. (2002a) e também três casos de O111:H-, isolados de crianças entre 1 a 4 anos com quadro diarréico (GUTH et al., 2002b).

Entre nossos isolados, como dito anteriormente, encontramos o sorotipo O111:H- em pelo menos 6 diferentes animais, pertencentes a cinco diferentes fazendas, situadas no estado de São Paulo. Pelo fato do gado ser conhecidamente um dos principais reservatórios de amostras STEC, talvez seja possível, através de estudos complementares traçarmos um paralelo entre as amostras O111:H- isoladas de humanos e nossas amostras O111:H- isoladas de bovinos.

Obtivemos também o isolamento de quatro amostras do sorotipo O26:H11. Apesar de 3 delas serem *stx* negativas, a amostra Catita (8) apresentou-se positiva para o gene *stx2*. Assim como a O111:H-, este sorotipo também já foi isolado de casos de SHU aqui no Brasil (GUTH et al., 2002a, 2002b).

Além destes sorotipos já isolados de casos de SHU, no Brasil e no exterior, obtivemos ainda 1 amostra do sorotipo O118:H16 e 1 amostra do sorotipo O103:H21. Ambas já foram reconhecidas como EHEC, tendo sido isoladas de casos de CH e SHU, na Alemanha (BEUTIN et al., 1998; WIELER et al., 2000).

Quanto ao isolamento de O157:H7, apesar de termos utilizado uma das técnicas mais específicas e eficientes para detecção de O157:H7, ou seja, a Separação Imuno Magnética, não conseguimos o isolamento de nenhuma *E. coli* representante deste sorotipo, entre as 50 amostras fecais *stx*⁺ estudadas e as 50 amostras de carne bovina crua moída, coletadas em açougues da região metropolitana de São Paulo.

Ocorreram também três casos de isolamento de amostras O157:H7 no Estado de São Paulo. Um deles foi identificado entre 2573 amostras de *E. coli* que foram analisadas e isoladas de pacientes com diarreia entre 1976 e 1999, pelo Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz. Esta amostra em particular foi obtida de um paciente portador do vírus do HIV, de 18 anos. As duas outras amostras O157:H7 foram isoladas de uma garota de 4 anos e de um idoso, ambos com grave diarreia, num hospital de Campinas, São Paulo, em junho e julho de 2001, respectivamente. As três amostras continham seqüências para os genes *eae* e *stx2* e produziam hemolisina (IRINO et al., 2002).

Além de termos encontrado uma amostra do sorotipo O26:H11 portadora do gene *stx*, encontramos também amostras deste sorotipo que não apresentavam os genes que codificam para a toxina Stx, o que as exclui do grupo das EHEC, podendo ser

consideradas como EPEC atípicas (TRABULSI et al., 2002). Obtivemos ainda um grande número de amostras de outros sorogrupos com todas as características de virulência encontradas em amostras causadoras de SHU e CH, pertencentes ou não ao sorotipo O157:H7. Este fato nos leva a crer na hipótese de termos encontrado no gado bovino uma importante fonte de infecção de amostras patogênicas para o homem, da mesma maneira que ocorre em outros países da Europa e também nos Estados Unidos (WIELER et al., 1992; BLANCO et al., 1992a; WIELER et al., 1998; PRADEL et al., 2000; WIELER et al., 2000).

Um fator importante a ser ressaltado é a quantidade de isolados possuindo os três genes de maior importância para amostras STEC (*eae*, *stx* *Ehly*), associados, em nossas amostras em animais diarreicos e sadios. Obtivemos um percentual de 2,8% de positividade para estas amostras isoladas de animais sadios. Este percentual sobe para 5,3% de positividade entre os isolados de animais diarreicos. O genótipo *eae+stx1+Ehly+* foi o mais freqüente entre as amostras isoladas de animais diarreicos (11 amostras) e entre as amostras isoladas de animais sadios (7 amostras), no que se refere aos 3 genes associados. Estas amostras são capazes de provocar diarreia mais aguda em bezerros, pois além do gene *stx*, possuem o gene *eae*, o que as torna capazes de provocar as lesões A/E (WIELER et al., 1992; DORN et al., 1993).

Quando falamos de amostras sem os três genes associados, o genótipo mais freqüente entre animais diarreicos é *eae+*, encontrado em 15 amostras. Já em isolados de animais diarreicos, obtivemos o mesmo número entre os genótipos *eae+* e *stx1+stx2+Ehly+*, ou sejam, 10 amostras de cada.

Os genótipos menos encontrados entre as amostras isoladas de animais diarreicos foram *eae+stx2+Ehly+* (uma amostra) e *eae+* (uma amostra). Já entre os animais sadios, os genótipos menos freqüentes foram *eae+stx2+Ehly+* (uma amostra), *eae+stx1+* (uma amostra) e *stx1+Ehly+* (uma amostra).

O teste de RAPD (random amplified polymorphic DNA) é uma técnica baseada no uso de “primers” de seqüências curtas, aleatórias, de nove a 10 bases de tamanho, que hibridizam com as seqüências de DNA cromossômico em baixas temperaturas de anelamento e que podem ser usadas para iniciar a amplificação de regiões do genoma bacteriano. Se dois “primers” de RAPD se anelam a determinada distância um do outro, em orientação própria, resulta num produto de PCR com comprimento molecular correspondente à distância entre os dois “primers”. O número e a localização desses sítios de ligação para estes “primers” aleatórios variam para diferentes amostras de uma espécie bacteriana. Assim, separando-se os produtos da amplificação através de eletroforese em gel de agarose, forma-se um padrão de bandas que, em teoria, é característico para aquela amostra bacteriana em particular (OLIVE & BEAN, 1999).

O RAPD foi realizado com as amostras do sorotipo O111:H⁻ e com a amostra do sorotipo O111:H19, devido ao fato do O111 ser o sorogrupo mais encontrado entre as amostras isoladas e estar envolvido em casos típicos de SHU (PRADEL et al., 2000; GERBER et al., 2002). No RAPD podemos verificar a formação de dois grupos principais, que chamamos de grupo A, que possui oito amostras e grupo B, que possui as outras três, sendo que eles têm menos de 0,25 de similaridade. Porém, no grupo B,

encontramos duas amostras isoladas do mesmo animal, 002HV (5) e 002HV(10) e a amostra 02HV (5), que curiosamente apresentou sorotipo diferente (O111:H19) das outras duas amostras deste grupo. Portanto, podemos dizer que a amostra 002HV (5), apesar de estar no mesmo grupo (B), é diferente das amostras 02HV (10) e 61CC (7).

As amostras do grupo A que foram mais similares (aproximadamente 0,75) são 002SB (14) e 002HV (4) e foram isoladas de fazendas diferentes, porém em cidades próximas (Santo Antonio de Posse e Espírito Santo do Pinhal). Neste mesmo grupo A, encontramos amostras do mesmo animal, mas que não estão no mesmo grupo, como Beleza (2), no subgrupo A1 e Beleza (4), no subgrupo A2. Outras duas amostras, Mora (2) e Mora (4), são do mesmo animal, porém com aproximadamente 0,50 de similaridade apenas, se enquadrando em outro subgrupo denominado A3. Isto se deve, provavelmente, a diferentes resultados encontrados entre estas amostras isoladas do mesmo animal.

Embora não tenhamos nenhum grupamento com especial relevância, é importante ressaltarmos que um grande número de problemas tem sido relatado para a técnica de RAPD, que contribuem para a falta de reprodutibilidade e padronização da técnica. O fato dos “primers” não serem direcionados contra nenhum locus genético particular, muitos dos primeiros eventos são o resultado de hibridizações imperfeitas entre os “primers” e os sítios alvo. Assim o processo de amplificação é extremamente sensível a pequenas mudanças na temperatura de anelamento que podem levar a variabilidade nos padrões de banda. O uso de “primers” empiricamente desenhados, cada qual com suas condições de reação e reagentes particulares, também fazem da padronização da técnica uma tarefa difícil (OLIVE & BEAN, 1999).

Ainda sobre as amostras *eae* positivas isoladas, foram detectados por PCR, principalmente, os genes que codificam os subtipos de intimina β 1 (35,4% das amostras testadas) e o subtipo γ 2 (31,2%). Conseguimos também duas amostras com o subtipo ζ (4,2%), uma única amostra positiva para o subtipo μ (1%) e três amostras com subtipo ε (6,2%). Dez amostras não puderam ser subtipadas, pois não amplificaram com nenhum de nossos iniciadores. Estes dados podem indicar a presença de um novo tipo de intimina entre as amostras, visto que os testes foram realizados duas vezes para confirmação de resultados. As intiminas β 1 e γ 2 são as mais frequentemente encontradas em isolados humanos na Espanha (BLANCO et al., 2004). A intimina μ não havia sido descrita até o presente momento em isolados de origem animal. Este é o primeiro relato desta variante de intimina em isolados de bovinos (BLANCO – comunicação pessoal).

Outro achado relevante é que nenhuma das amostras *eae*⁺ amplificou com os iniciadores específicos para *bfp* e *eaf*. Segundo DONNENBERG et al., (1997) e KENNY et al., (1997), estes dois fatores não são encontrados entre amostras STEC e EHEC. Entre as amostras *eae* positivas que isolamos em nossa Tese de Mestrado (AIDAR et al., 2000), as mesmas não amplificaram com os genes *bfp* e *eaf*, apesar de não produzirem toxina de Shiga, confirmando assim nossos resultados. Na realidade estes genes têm sido encontrados em amostras humanas de EPEC típicas como O111:H2, O142:HH6, O119:H2 e O127:H6 (TRABULSI et al., 2002).

Do total de nossas amostras, 22 (22,45%) apresentaram-se positivas para *saa*. Estas 22 amostras foram isoladas de 17 animais distintos. Esta adesina autoaglutinante foi descrita primeiramente em uma amostra *eae*- do sorotipo O113:H21, responsável por um surto de SHU (PATON et al., 2001). Nossos dados também demonstram que esta adesina não é encontrada em amostras *eae*+. JENKINS et al. (2003), demonstraram uma significativa associação de *saa* com amostras STEC bovinas e sugerem que possa haver uma função de Saa na ligação destas amostras ao intestino do animal. Estes mesmos autores sugerem novos trabalhos com estas amostras, tanto “in vivo” como “in vitro” para examinar a função de Saa na ligação destas amostras a mucosa intestinal bovina.

Outro importante aspecto encontrado em nossas amostras foi a capacidade das mesmas provocarem as lesões A/E. Amostras *stx1*+ *eae*+, causando lesões A/E podem provocar quadros diarreicos mais agudos em bezerros (WIELER et al., 1992; DORN et al., 1993).

No caso de amostras EHEC, ou sejam, amostras de STEC isoladas de casos de CH e SHU em humanos, o gene *eae* está normalmente presente, sendo, por consequência, amostras capazes de provocar lesões A/E.

Em nossas 48 amostras *eae*+ testadas por FAS, 33 (68,75%) foram capazes de provocar polimerização de actina, sugerindo a habilidade de produzir as lesões A/E “in vitro” (KNUTTON, 1994). A grande maioria delas apresentou aderência do tipo localizada-like nos testes de aderência à linhagem celular HEP-2, o que já era esperado. Cinco amostras com aderência agregativa também resultaram em FAS positivo. Este fenótipo também já havia sido demonstrado por VIEIRA et al. (2001), onde os autores descrevem 2 amostras com aderência do tipo agregativa, positivas para polimerização de actina.

Obtivemos 11 amostras com aderência do tipo não-característica, e 2 amostras com aderência do tipo difusa, todas *eae*+, as quais tiveram resultado positivo também para FAS.

Foram testadas 19 amostras *eae*+ pelo método de Western blot, para detecção da expressão de intimina. Destas 19 amostras, 5 tiveram resultado negativo em Western blot, embora três delas fossem positivas em FAS. Treze amostras expressaram intimina, detectada tanto em Western blot como indiretamente através de FAS, utilizado para detectar lesões A/E. Uma amostra Western blot positiva não provocou a lesão A/E, como comprovado em teste de FAS. Nas duas amostras que tiveram resultados negativos para ambos os testes, podemos deduzir que estas amostras perderam a capacidade de expressão do gene *eae* “in vitro”. Já nas amostras que tiveram resultado positivo em somente um dos testes (3 amostras FAS+ e Western blot – e uma amostra FAS- e Western blot +, não pudemos chegar a conclusões exatas, visto que os dois testes detectam a presença da intimina, sendo um de maneira direta e o outro de maneira indireta.

Outras toxinas cujos genes foram encontrados entre nossos isolados foram a CNF, LT-II e EAST1.

Obtivemos 11 (11,22%) amostras *cnf*⁺, isoladas de nove diferentes animais. Destas 11 amostras, nove possuíam o genótipo *cnf2*+*stx1*+, uma possuía o genótipo *stx1*+*stx2*+*cnf2*+ e o genótipo *stx1*+*cnf1*+*cnf2*+ foi também encontrado em uma amostra de *E. coli*. Uma das amostras fecais possibilitou o isolamento de cinco amostras de *E. coli*, sendo três delas positivas para *cnf*. Uma apresentou-se *stx1*+*cnf1*+*cnf2*+ e duas apresentaram-se *stx1*+*cnf2*+. Sete (7) amostras foram isoladas de cinco diferentes animais diarreicos e quatro amostras foram isoladas de quatro diferentes animais sadios.

A função das toxinas CNF na patogênese de infecções por *E. coli* ainda permanece incerta, porém, amostras NTEC produzindo CNF1 têm sido isoladas de infecções intestinais e extraintestinais em humanos, ao passo que amostras CNF2 positivas têm sido isoladas de bezerros com diarreia e septicemia (ALONSO et al., 1987; BLANCO et al., 1992a; BLANCO et al., 1992b; BLANCO et al., 1993b).

BURNS et al. (1996) também descreveram a co-produção de Stx e CNF2 por uma amostra isolada de um bezerro diarreico. Também conforme BURNS et al. (1996), nenhuma de nossas amostras CNF⁺ amplificou o gene *eae*.

Nenhuma das amostras por nós isoladas apresentou-se positiva para os genes que codificam as toxinas STa, STb e LT-I. Para LT-I e STb este fato já era esperado, uma vez que não existem relatos do isolamento de amostras produtoras destas duas toxinas em bezerros. O não isolamento de amostras STa positivas entra em discordância com trabalhos como o de BLANCO et al. (1992b), onde se obteve o isolamento das mesmas de fezes de bovinos. Todavia é bom ressaltar que os bezerros estudados em nossa pesquisa tinham entre 4 a 5 meses de idade, quando a diarreia das amostras ETEC produtoras de STa não ocorrem mais (GUINÉE et al., 1981).

Apesar de a grande maioria das amostras ETEC bovinas, em trabalhos no exterior (BLANCO – comunicação pessoal, SERIWATANA et al., 1988), produzirem a enterotoxina LT-II, esta foi encontrada em apenas 1 dos 546 animais por nós estudados. O primeiro relato desta toxina aqui no Brasil foi feito em nossa Tese de Mestrado, a qual foi posteriormente publicada (UGRINOVICH et al., 2002). Esta única amostra foi detectada por PCR entre 52 amostras isoladas de bovinos. Este fato nos estimula a continuarmos na tentativa de isolamento destas amostras.

Apesar de EAST1 ser freqüente entre as amostras que apresentam aderência do tipo Agregativa, nenhuma das duas amostras positivas para esta toxina apresentou este padrão de aderência, porém, ambas abrigavam genes que codificam para Stx, sendo uma isolada de animal saudável, do sorotipo O111:H⁻ (já descrito como STEC não O157) e apresentando aderência do tipo difusa, e a outra isolada de animal diarreico, apresentando aderência do tipo não característica e o sorotipo O7:H10. EAST1 já foi anteriormente descrita entre amostras EHEC (YAMAMOTO & TANEIKE, 2000).

Das 48 amostras positivas para o gene *eae* testadas quanto à inserção de LEE, a grande maioria (30 amostras) apresentou *selC* intacto e *pheU* interrompido, sugerindo assim a presença de LEE inserido nesta região. Seis (6) amostras apresentaram *selC* intacto e *pheU* intacto, levando-nos a crer que o LEE nestas amostras pudesse estar inserido em *pheV* (JORES et al., 2001) ou em uma outra região ainda não estudada.

Três amostras amplificaram *pheU* intacto e não apresentaram nenhuma banda de amplificação em *selC*, assim como 7 amostras apresentaram o mesmo fenômeno em *selC*, mas apresentaram *pheU* interrompido. Nestas amostras onde *pheU* está interrompido, podemos aceitar o fato de LEE estar presente neste locus, apesar de não termos a amplificação dos iniciadores para *selC*, porém, nas amostras onde *selC* não amplifica e *pheU* está intacto, podemos sugerir que LEE pode estar inserido em *selC* mas a variação de seqüências nas junções impediu a amplificação, ou outra Ilha de Patogenicidade pode estar inserida em *selC*.

O presente trabalho embora bastante amplo, deixa vastas perspectivas com relação a continuidade do estudo das STEC no Estado de São Paulo, sob o ponto de vista básico e aplicado. Vários aspectos sob esta ótica merecem ser destacados, como o isolamento de amostras de bezerros de sorotipos reconhecidamente pertencentes ao grupo das EHEC, alguns dos quais já foram isolados recentemente de casos de infecção no homem no Estado de São Paulo, inclusive com evolução para CH e SHU.

Foram encontrados também outros sorotipos pertencentes a amostras de EPEC atípicas (127:H40 e O26:H11).

Ainda gostaríamos de ressaltar que no Continente Americano é o único trabalho que pesquisou uma ampla gama de subtipos de intimina, tendo sido encontradas algumas incomuns em amostras de STEC bovinas, como a ζ e a μ ., constatada esta última, pela primeira vez no mundo em amostras de origem animal (BLANCO – comunicação pessoal).

Finalmente, a diversidade de sorotipos encontrados, as combinações dos diferentes tipos de adesão com reação de FAS positiva, não deixam de ser outro aspecto cativante, merecedor de estudos adicionais.

Sem dúvida, diante dos diferentes objetivos propostos, acreditamos ter produzido uma pesquisa valiosa que certamente servirá de subsídio para todos aqueles que se dedicam ao estudo das *E. coli* diarreiogênicas de origem animal que podem infectar humanos e outros animais, desta espécie ou de outras.

XI - CONCLUSÕES

1. Obtivemos, em alguns animais, o isolamento de mais de uma amostra de *E. coli*, possuindo diferentes características genotípicas, ou seja, com genes codificando para diferentes fatores de virulência.
2. Somente 25 (25,5%) amostras, do total de 98, não foram capazes de aderir à linhagem celular HEp-2.
3. As principais intiminas detectadas em amostras isoladas de bovinos no Estado de São Paulo são a $\beta 1$ e a $\gamma 2$, encontradas em 17 e 15 amostras respectivamente, sendo a $\gamma 2$ predominante no sorotipo O111:H. Já a intimina $\beta 1$ foi encontrada em uma maior diversidade de sorotipos.
4. As intiminas ϵ (3 amostras), ζ (2 amostras) e μ (1 amostra) são menos predominantes nos isolados de bovinos, não tendo sido encontrados os genes que codificam para o subtipo α no Estado de São Paulo.
5. Das amostras testadas em Western blot, 73,7% foram capazes de expressar intimina
6. Há uma grande diversidade de subtipos de intimina entre as amostras de bovinos em nosso país, visto que 21% de nossas amostras não puderam ser tipadas, indicando um novo ou novos subtipos de intimina.
7. Quinze (88,2%) das amostras *eae*⁺ que apresentaram aderência do tipo “localizada-like”, apresentaram resultado positivo no teste de FAS, indicando a expressão da proteína intimina.
8. Somente 10 das 48 (20,8%) amostras *eae*⁺ tiveram resultado negativo em FAS, não demonstrando a expressão da proteína.
9. Amostras com aderência dos tipos Difusa, Agregativa e também Não Característica, que possuem o gene *eae*, são capazes de provocar lesões A/E, como demonstrado nos testes de FAS.
10. O gene *Ehly* esteve presente em 52,9% das amostras de *E. coli* isoladas de animais diarreicos e em 60,5% das amostras isoladas de animais sadios, o que pode indicar que este gene não tenha grande relevância na patogenicidade das amostras isoladas destes animais, assim como o gene *eae* (43,6% das *E. coli* isoladas de animais diarreicos e 55,8% das *E. coli* isoladas de animais sadios).
11. Os genes que codificam para Stx1 e Stx2 foram encontrados em 87,3% das amostras isoladas de animais diarreicos e em 65,1% das amostras isoladas de animais sadios, indicando uma maior frequência em animais doentes.

12. A presença dos três principais genes de virulência (*eae*, *stx*, *Ehly*), identificados na mesma amostra foi mais freqüente entre os isolados de animais diarreicos (5,68%) contra 2,83%, isolados de animais sadios.
13. A presença de *pheU* interrompido em 77,1% das nossas amostras *eae*⁺ pode significar uma predileção do LEE para inserção neste locus, entre as amostras de origem bovina ou uma possível origem clonal.
14. Devido ao grande número de isolados de *E. coli* portadoras dos 3 genes mais importantes presentes em amostras EHEC, e o isolamento de sorotipos já descritos como tal (O111:H-, O26:H11, O103:H21 e O118:H16) em humanos, em outros países, e também no Brasil (O111:H-, O26:H11) podemos concluir que o gado bovino é uma importante fonte de infecção destas amostras, com potencial patogênico para humanos.
15. Apesar das amostras testadas por RAPD serem todas do mesmo sorogrupo (O111), os dados resultantes deste teste não demonstram similaridade suficiente para podermos deduzir que elas tenham a mesma origem clonal.

XII - REFERÊNCIAS

- ACRES, S.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **J. Dairy Sci.**, 68: 229-256, 1985.
- ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A. G.; TRABULSI, L.R.T.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, 36:662-668, 1998.
- AIDAR, L; PENTEADO, A.S.; TRABULSI, L.R.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; CASTRO, A.F.P. Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. **Can. J. Vet. Res.**, 64:15-20, 2000.
- ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ, E.A.; GARABAL, J.I. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF 1). **Res. Microbiol.**, 143:869-878, 1992.
- ALONSO, P.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; GONZÁLEZ, E.A. Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections: relation with haemagglutination. **FEMS Microbiol. Lett.**, 48:391-396, 1987.
- ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS Jr., J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, 18:29-51, 1996.
- BAIN, C.; KELLER, R.; COLLINGTON, G.K.; TRABULSI, L.R.; KNUTTON, S. Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 66: 3900-3908, 1998.
- BALDWIN, T.J.; BROOKS, S.F.; KNUTTON, S.; MANJARREZ-HERNANDEZ, H.A.; AITKEN, A.; WILLIAMS, P.H. Protein phosphorylation by protein kinase C in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 58:761-765, 1990.
- BALDWIN, T.J.; WARD, W.; AITKEN, A.; KNUTTON, S.; WILLIAMS, P.H. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 59:1599-1604, 1991.

- BANATVALA, N.; GRIFFIN, P.M.; GREENE, K.D.; BARRETT, T.J.; BIBB, W.F.; GREEN, J.H.; WELLS, J.G. THE HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME STUDY COLABORATORS. The United States Nacional prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, sorologic, clinical, and epidemiologic findings. **J. Infect. Dis.**, 183:1063-1070, 2001.
- BANDO, S.Y.; DO VALLE, G.R.F.; MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R.; MOREIRA-FILHO, C.A. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. **FEMS Microbiol. Lett.**, 165: 159-165, 1998.
- BEGUM, D.; STROCKBINE, A.; SOWERS, E.G. ; JACKSON, M.P. Evaluation of a technique for identification of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 3153-3156, 1993.
- BETTEY, M.J.; MILLER, V.L.; MEKALANOS, J.J. Genetics of bacterial enterotoxins. **Ann. Rev. of Microbiol.**, 40: 577-605, 1986.
- 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.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. **J. Clin. Microbiol.**, 34:2812-2814, 1996.
- BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Human infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerg. Infect. Dis.**, 4:635-639, 1998.
- BHAN, M.K.; BHANDARI, N.; SAZAWAL, S.; CLEMENTS, J.; RAJ, P.; LEVINE, M.M.; KAPER, J.B. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. **Bull World Health Organ**, 67:281-288, 1989.
- BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; GARCÍA, S.; BLANCO, M.; REGUEIRO, B.; BERNÁZDEZ, I. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-western Spain). **Vet. Microbiol.**, 18:297-311, 1988.
- BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BLANCO, M.; GONZÁLEZ, E.A. Mecanismos de patogénese de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, 6:163-176, 1991a.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; GARABAL, J.I.; GONZÁLEZ, E.A. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. **Microbiologia SEM**, 7: 57-72, 1991b.

- BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, M.; GARABAL, J.L.; ALONSO, M.P.; FERNÁNDEZ, S.; VILLANUEVA, R.; AGUILERA, A.; GARCIA, M.A.; TORRES, J.; REY, A.; JANSEN, W.H.; GUINÉE, P.A.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with infant diarrhea in Galicia (North-western Spain). *J. Med. Microbiol.*, **35**:162-167, 1991c.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GARABAL, J.I.; GONZÁLEZ, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 e CNF2. *FEMS Microbiol. Letters*, **96**: 155-160, 1992a.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; GARABAL, J.I.; GONZÁLEZ, E.A. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. **Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo**: pp.361, 1993a.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. En: Verocytotoxigenic *E. coli*. Eds. Duffy, G.; Garvey, P.; McDowell, a. **Food and Nutrition Press. EE. UU.**, p.113-148., 2001.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: Manual de Microbiología Veterinaria. Eds. Vadillo, S.; Piriz, S.; Mateos, E. **Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid**. pp. 301-325, 2002.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; ALONSO, M.P.; COIRA, A.; RODRÍGUEZ, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; USERA, M.A. Verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) in Spain: prevalence, serotypes and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and human infections. *Exp. Biol. Med.* **228**:345-351, 2003.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; HERMIDA, M.I.B. *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. Disponível em <http://www.lugo.usc.es/~ecoli/E.coli2.html>. Acesso em: 25 de março de 2004.
- BLANCO, J.E. *Escherichia coli* toxigénicos em muestras clínicas y alimentos. Mecanismos de patogénesis de *E. coli* enteropatógenos para conejos y septicémicos aviares. Tesis Doctoral en microfichas nº558. **Servicio de Publicaciones e intercambio científico. Universidad de Santiago de Compostela**, 1996.
- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; MORA, A.; BALAGUER, L.; MOURIÑO, J.A.; JANSEN, W.H. O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, **34**:3101-3107, 1996a.

- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colitis by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens. Relationship with in vivo pathogenicity. **J. Clin. Microbiol.**, 35:2953-2957, 1997a.
- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; JANSEN W.H.; GARCÍA, V.; VÁZQUEZ, M.L.; BLANCO, J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). **Vet. Microbiol.**, 61:229-235, 1998.
- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; DAHBI, G.; COIRA, M.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, 42:311-319, 2004a.
- BLANCO, M. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotizantes y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Tesis Doctoral en microficha nº 191. **Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela**, 1992.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; GARABAL, J.I.; BLANCO, J.E. *Escherichia coli* toxigénicos de origen bovino. **Med. Vet.** 9: 199-213, 1992b.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Am. J. Vet. Res.**, 54:1446-1451, 1993a.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; VERBRUGGEN, A.; JANSEN, W.H. Serotypes of bovine *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor type 2 (CNF 2). **Vet. Microbiol.**, 39: 83-88, 1994.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSALOBRE, C.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; JUÁREZ, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **J. Microbiol. Meth.**, 26:95-101, 1996b.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; MORA, A.; PRADO, C.; FERNANDEZ, L.; RIO, M.; RAMOS, J.; 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, 1996c.
- BLANCO M.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ E.A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T.A.T.; ZERBINI, L.F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; BLANCO, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* strain belonging to different O:H,K serotypes. Relation with toxic phenotypes. **J. Clin. Microbiol.**, 35:2958-2963, 1997b.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M.P.; DAHBI, G.; GONZALEZ, E.A.

- BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J. Clin. Microbiol.**, 41:1351-1356, 2003b.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing of a new intimin variant gene (*eae*ξ). **J. Clin. Microbiol.**, 42:645-651, 2004b.
 - BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. KatP, a novel catalase peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiol.**, 142:3305-3315, 1996.
 - BURNS, A.L.; BALL, H.J.; FINLAY, D.A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. **Vet. Microbiol.**, 49:235-241, 1996.
 - CAMPELLONE, K.G. & LEONG, J.M. Tails of two Tirs: actin formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. **Curr. Opin. Microbiol.**, 6:82-90, 2003.
 - CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L.G.; RUGGERI, F.M.; ZONA, C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect. Immun.**, 39: 1300-1306, 1983.
 - CAPRIOLI, A.; LUZZI, I.; ROSMINI, F.; PASQUINI, P.; CIRINCIONE, R.; GIANVITI, A.; MATTEUCCI, M.C.; RIZZONI, G.; & the SHU Italian Study Group. Hemolytic-Uremic Syndrome and vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in Italy. **J. Infect. Dis.**, 166:154-158, 1992.
 - CHARNEY, A.N.; GOTS, R.E.; FORMAL, S.B.; GIANNELLA, R.A. Activation of intestinal mucosal adenylate cyclase by *Shigella dysenteriae* I enterotoxin. **Gastroenterology**, 70:1085-1090, 1976.
 - CRANE, J.K.; McNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, 3:197-211, 2001.
 - CRAVIOTO, A.; GROSS, R.J.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, R. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, 3:95-99, 1979.
 - DANBARA, H.; KOMASE, K.; ARITA, H.; ABE, H.; YOSHIKAWA, M. Molecular analysis of enterotoxins plasmids of enterotoxigenic *E. coli* of 14 different O serotypes. **Infect. Immun.**, 56:1513-1517, 1988.
 - DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.**, 125: 407-411, 1973.

- DEAN-NYSTRON, E.A.; BOSWORTH, B.T.; CRAY Jr, W.C.; MOON, H.W. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. **Infect. Immun.**, 65: 1842-1848, 1997.
- DEAN-NYSTRON, E.A.; BOSWORTH, B.T.; MOON, H.W.; O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. **Infect. Immun.**, 66: 4560-4563, 1998.
- DE RYCKE, J.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BLANCO, M.; BOIVIN, R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 694-699, 1990.
- DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Vet. Res.**, 30: 221-233, 1999.
- DHO, M. & FAIRBROTHER, J. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Vet. Res.**, 30: 299-316, 1999.
- DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends Microbiol.**, 5: 109-114, 1997.
- DORN, C.R.; FRANCIS, D.H.; ANGRICK, E.J.; WILLGOHS, J.A.; WILSON, R.A.; COLLINS, J.E.; JENKE, B.H.; SHAWD, S.J. Characteristics of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. **Vet. Microbiol.**, 36: 149-159, 1993.
- DUFFY, G.; GARVEY, P.; COIA, J.; WATESON, Y.; MCDOWELL, D.A. (Eds.) Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concertec Action CT98-3935. Vol 1: Methods for verocytotoxigenic *E. coli* (1999a). **Teagasc, The National Food Centre, Dublin, Ireland.**
- DUFFY, G.; GARVEY, P.; COIA, J.; WATESON, Y.; MCDOWELL, D.A. (Eds.) Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concertec Action CT98-3935. Vol 2: Survival and growth of verocytotoxigenic *E. coli* (1999b). **Teagasc, The National Food Centre, Dublin, Ireland.**
- DUFFY, G.; GARVEY, P.; COIA, J.; WATESON, Y.; MCDOWELL, D.A. (Eds.) Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concertec Action CT98-3935. Vol 3: Pathogenicity and virulence of verocytotoxigenic *E. coli* (2000). **Teagasc, The National Food Centre, Dublin, Ireland.**
- DUFFY, G.; GARVEY, P.; COIA, J.; WATESON, Y.; MCDOWELL, D.A. (Eds.) Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concertec Action CT98-3935. Vol 4: Control of verocytotoxigenic *E. coli* (Edición especial publicado en el International Journal of Food Microbiology Vol 66(1-2) (2201a). **Teagasc, The National Food Centre, Dublin, Ireland.**

- DUFFY, G.; GARVEY, P.; COIA, J.; WATESON, Y.; MCDOWELL, D.A. (Eds.) Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concertec Action CT98-3935. Vol 5: Epidemiology of verocytotoxigenic *E. coli* (2001b). Teagasc, The National Food Centre, Dublin, Ireland.
- EBEL, F.; PODZADEL, T.; ROHDE, M.; KRESSE, A.U.; KRÄMER, S.; DEIBEL, C.; GUZMAN, C.; CHAKRABORTY, T. Initial binding of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depends on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol. Microbiol.*, 30:147-161, 1998.
- ELIAS, W.P.; SUZART, S.; TRABULSI, L.R.; NATARRO, J.P.; GOMES, T.A. T. Distribution of aggA and aafA gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*. *J. Med. Microbiol.*, 48:597-599, 1999.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K.; YUTSUDO, T.; YAKEDA, Y.; OGASAWARA, K.; IGARASHI, K. The site of action of a verotoxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes: RNA N- glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.*, 171: 45-50, 1988.
- ESCHERICH, T. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Medizin.*, 3:515-522, 1885.
- EWING, W.H. The genus *Escherichia*. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4 ed. Cap. 6, Elsevier, New York.: 93-134, 1986.
- FALBO, V.; FAMIGLIATTI, M.; CAPRIOLI, A. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. *Infect. Immun.*, 60:2182-2187, 1992.
- FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHIMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L.H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2460-2463, 1994.
- FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; TRABULSI, L.R.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G.; MATTHEWS, S. Intimin and the host cell – is it bound to end in Tir(s)? *TRENDS Microbiol.*, 9:214-218, 2001.
- GAASTRA, W. & GRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46:129-161, 1982.
- GANNON, V.P.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E.J. Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31:1268-1274, 1993.

- GERBER, A.; KARCH, H.; ALLERBERGER, F.; VERWEYEN, H.M.; ZIMMERHACKL, L.B. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the Hemolytic-Uremic Syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. **J.Infect. Dis.**, 186:493-500, 2002.
- GHOSH, A.R.; NAIR, G.B.; NAIK, T.N.; PAUL, M.; PAL, S.C.; SEM, D. Enteroadherent *Escherichia coli* is an important diarrhoeagenic agent in infants aged below 6 months in Calcutta, India. **J. Med. Microbiol.**, 36:264-268, 1992.
- GILL, D.M.; RICHARDSON, S.H. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of *E. coli*: comparison with cholera toxin. **J. Infect. Dis.**, 141: 64-70, 1980.
- GOFFAUX, F.; CHINA, B.; MAINIL, J. Organization and "in vitro" expression of *esp* genes of the LEE (locus of enterocyte effacement) of bovine enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Vet. Microbiol.**, 83:275-286, 2001.
- GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. Serotypes and antibiotic resistance of verotoxigenic (VTEC) and necrotizing (NTEC) *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhoea. **FEMS Microbiol. Letters**, 60:31-36, 1989
- GOOSNEY, D.; DeVINNEY, R.; PFUETZNER, R.; FREY, E.; STRYNADKA, N.C.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. **Curr. Biol.**, 10:735-738, 2000.
- GOOSNEY, D.L.; DeVINNEY, R.; FINLAY, B.B. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestal. **Infect. Immun.**, 69:3315-3322, 2001.
- GRIFFIN, P.M.; OLMSTEAD, L.C.; PETRAS, R.E. *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. **Gastroenterology**, 99:142-149, 1990.
- GRIFFIN, P.M. & TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.**, 13:60-98, 1991.
- GUINÉE, P.A.M.; ACTERBERG, C.M.; JANSEN, W.H. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. **Appl. Microbiol.**, 24:127-131, 1972.
- GUINÉE, P.A.M.; JANSEN, H.W.; WADSTRÖM, T.; SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. En: Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science. EDS. Leeww, P.W.; Guinée, P.A.M. **Martinus Nijhoff Publishers. Holanda**. 13:126-162, 1981.

- GUNZBURG, S.T.; TORNIEPORTH, N.G.; RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-bases detection of the bundle-forming pilus gene. **J. Clin. Microbiol.**, 33:1375-1377, 1995.
- GUTH, B.E.C.; TWIDDY, E.M.; TRABULSI, L.R.; HOLMES, R.K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 54: 529-536, 1986.
- GUTH, B.E.C.; LOPES, R.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 8:535-536, 2002a.
- GUTH, B.E.G.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from children in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97:1085-1089, 2002b.
- GYLES, C.L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **CAB International, UK**: 1-649, 1991.
- HALL, G.A.; REYNOLDS, D.J.; CHANTER, N.; MORGAN, J.H.; PARSONS, K.R.; DEBNEY, T.G.; BLAND, A.P.; BRIDGER, J.C. Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. **Vet. Pathol.**, 22: 156-163, 1985.
- HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, 3:345-375, 1990.
- HOLLAND, R.E.; WILSON, R.A.; HOLLAND, M.S.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MULLANEY, T.P.; WHITE, D.G. Characterization of *eae*⁺ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. **Vet. Microbiol.**, 66: 251-263, 1999.
- HOLMES, R.K.; TWIDDY, E.M.; PIKETT, C.L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 53: 464-473, 1986.
- IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVAES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 8:446-447, 2002.
- JACEWICZ, M.; CLAUSEN, H.; NUDELMAN, E.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.T. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XI. Isolation of shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. **J. Exp.Med.**, 163: 1391-1404, 1986.
- JACKSON, M.P.; NEILL, R.J.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K.; NEWLAND, J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for

Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol. Lett.**, 44:109-114, 1987.

- JARVIS, K.G.; GIRON, J.A.; JERSE, A.E.; McDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92:7996-8000, 1995.
- JENKINS, C.; PERRY, N.T.; CHEASTY, T.; SHAW, D.J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G.J.; SMITH, H.R.; PATON, A.W.; PATON, J.C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **J. Clin. Microbiol.**, 41:1775-1778, 2003.
- JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 4:80-128, 1991.
- JOHNSON-HENRY, K.; WALLACE, J.L.; BASAPPA, N.S.; SONI, R.; WU, G.K.P.; SHERMAN, P.M. Inhibition of attaching and effacing lesion formation following enteropathogenic *Escherichia coli* and shiga toxin-producing *E. coli* infection. **Infect. Immun.**, 69:7152-7158, 2001.
- JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; BEZANSON, G.S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **Lancet** i:76, 1983.
- JORES, J.; RUMER, L.; KIEBLING, S.; KAPER, J.B.; WIELER, L.H. A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at *pheV* bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2. **FEMS Microbiol. Lett.**, 204:75-79, 2001.
- JORES, J.; ZEHEMKE, K.; EICHBERG, J.; RUMER, L.; WIELER, L.H. Description of a novel intimin variant (type ζ) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. **Exp. Biol. Med.**, 228:370-376, 2003.
- KANDEL, G.; DONOHUE-ROLFE, A.; DONOWITZ, M.; KEUSCH, G.T. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XVI. Selective targeting of shiga toxin to villus cells of rabbit jejunum explains the effect of the toxin on intestinal electrolyte transport. **J. Clin. Invest.**, 84:1509-1517, 1989.
- KAPER, J.B. & O'BRIEN, A.D. (Eds) *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, USA, 1998.
- KARCH, H. Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections: the need for a network involving microbiological laboratories and clinical and public health institutions. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 15:276-280, 1996.
- KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, 151:775-782, 1985.

- KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2:15-38, 1989.
- KAUFFMANN, R. The sorology of the Coli group. **J. Immunol.**, 57:71-100, 1947.
- KEENAN, K.P.; SHARPNACK, D.D.; COLLINS, H.; FORMAL, S.B.; O'BRIEN, A.D. Morphological evaluation of the effects of Shiga-toxin and *E. coli* Shiga-like toxin on the rabbit intestine. **Am. J. Pathol.**, 125:69-80, 1986.
- KENNY, B.; LAI, L.C.; FINLAY, B.B.; DONNENBERG, M.S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, 20:313-323, 1996.
- KENNY, B.; DeVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adhesion into mammalian cells. **Cell**, 91:511-520, 1997.
- KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Mol. Microbiol.**, 31:1229-1241, 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 Isle, 1985-8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. **Arch. Dis. Child.**, 65:722-727, 1990.
- KNUTTON, S.; LLOYD, D.R.; McNEISH, A.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, 55:69-77, 1987.
- KNUTTON, S. Attaching and effacing *Escherichia coli*. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. **CAB International, Wallingford, UK**, pp.567-591, 1994.
- KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLENM, M.J.; NISAN, I.; NEVES, B.C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, 17:2166-2176, 1998.
- KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; ANANTHA, R.P.; DONNENBERG, M.S.; ZORGANI, A.A. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Mol. Microbiol.**, 33:499-509, 1999.
- KRESSE, A.U.; ROHDE, M.; GUZMAN, C.A. the EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. **Infect. Immun.**, 67:4834-4842, 1999.

- KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, 24:107-117, 2000.
- LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, 155:377-389, 1987.
- LEVINE, M.M.; XU, J.; KAPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARRO, J.; KARCH, H.; WACHMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **J.Infect. Dis.**, 156:175-182, 1987.
- LÓPEZ, E.L.; DÍAZ, M.; GRINSTEIN, S.; DEVOTO, S.; MENDILAHARZU, F.; MURRAY, B.E.; ASHKENAZI, S.; RUBEGLIO, E.; WOLOJ, M.; VASQUEZ, M.; TURCO, M.; PICKERING, L.K.; CLEARY, T.G. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. **J. Infect. Dis.**, 160:469-475, 1989.
- MAINIL, J.G.; DUCHESNES, C.J.; WHIPP, S.C.; MARQUES, L.R.M.; O'BRIEN, A.D.; CASEY, T.A.; MOON, H.W. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. **Am. J. Vet. Res.**, 48: 743-748, 1987.
- MAINIL, J.G. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Vet. Res.**, 30:235-257, 1999.
- MAINIL, J.G.; JACQUEMIN, E.R.; KAECKENBEECK, A.E.; POHL, P.H. Association between the effacing (*eae*) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. **Am. J. Vet. Res.**, 54: 1064-1068, 1993.
- MARIANI-KURKDJIAN, M.; DENAMUR, E.; MILON, A.; PICARD, B.; CAVE, H.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; LOIRAT, C.; GOULLET, P.; SANSONETTI, P.J.; ELION, J. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. **J. Clin. Microbiol.**, 31:296-301, 1993.
- 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.
- McBAMRA, B.P.; KOUTSOURIS, A.; O'CONNELL, C.B.; NOUGAYREDE, J.P.; DONNENBERG, M.S. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. **J. Clin. Invest.**, 107:621-629, 2001.

- MILON, A.; OSWALD, E.; DE RYCKE, J. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Vet. Res.**, 30:203-219, 1999.
- MOHAMMAD, A.; PEIRIS, J.S.M.; WIJEWANTA, E.A.; MAHALINGAM, S.; GUNASEKARA, G. Role of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. **FEMS Microbiol. Lett.**, 26:281-183, 1985.
- MOHAMMAD, A.; PEIRIS, J.S.M.; SCOTLAND, S.M.; WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; CHEASTY, T. A longitudinal study of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* in cattle calves in Sri Lanka. **Epidemiol. Infect.**, 110:197-208, 1993.
- MOLENDRA, J.R. *Escherichia coli* (including O157:H7): an environmental health perspective. **Dairy, Food and Environ. Sanit.**, 14:742-747, 1994.
- MORA, A. *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) O157:H7 y no O157. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y resistencia a antibióticos de ECVT de origen humano y animal. **Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela**, 2002.
- MOXLEY, R.A.; FRANCIS, D.H. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. **Infect. Immun.**, 53:339-346, 1986.
- MOYER, M.P.; DIXON, P.S.; ROTHMAN, S.W.; BROWN, J.E. Cytotoxicity of Shiga toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. **Infect. Immun.**, 55: 1533-1535, 1987.
- NATARO, J.P.; SCALETSKY, I.C.A.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; TRABULSI, L.R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 48:378-383, 1985.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11:1742-201, 1998.
- NISHIKAWA, Y.; OGASAWARA, J.; HELANDER, A.; HARUKI, K. An outbreak of gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166. **Emerg. Infect. Dis.**, 5, 300, 1999.
- O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, 51:206-220, 1987.
- OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Minireview. **J. Clin. Microbiol.**, 37:1661-1669, 1999.
- OLSVIK, O.; STROCKBINE, N.A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: **Diag. Molec. Microbiol.**, 271-276, 1993.

- ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology. En: **Bergan T. Ed. Academic Press, New York**, 14:43-112, 1984.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. **J. Hyg. Camb.**, 95:551-575, 1985.
- OSWALD, E. (Ed.). Pathogenic *Escherichia coli* in animals. **Vet. Res.**, 30:129-344, 1999.
- OSWALD, E.; SCHIMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHÈS, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.**, 68:64-71, 2000.
- PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; LUCCHESI, P.M.A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; ETCHEVERRÍA, A.; ARROYO, G.H.; PARMA A.E. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. **BMC Microbiol.**, 2:1-5, 2002.
- PAI, C.H.; KELLY, J.K.; MEYERS, G.L. Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 51:16-23, 1986.
- PALVA, E.T.; HIRST, T.R.; HARDY, S.J.S.; HOLMGREN, J.; RANDALL, L. Synthesis of a precursor to the B subunit of heat-labile enterotoxin in *E. coli*. **J. Bacteriol.**, 146: 325-330, 1981.
- PATON, A.W.; PATON, J.C. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11:450-479, 1998a.
- PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **J. Clin. Microbiol.**, 36:598-602, 1998b.
- PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel auto agglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.**, 69:6999-7009, 2001.
- PEARSON, G.R.; BAZELEY, K.J.; JONES, J.R.; GUNNING, R.F.; GREEN, M.J.; COOKSON, A.; WOODWARD, M.J. Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animals with dysentery. **Vet. Rec.**, 145:370-373, 1999.
- PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **J. Infect. Dis.**, 181:1496-1500, 2000.

- 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.
- PRATS, G.; FRÍAS, C.; MARGALL, N.; LLOVET, T.; GAZTELURRUTIA, L.; ELCUAZ, F.; CANUT, A.; BARTOLOMÉ, R.M.; TORROBA, L.; DORRONSORO, Y.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; RABELLA, N.; COLL, P.; MIRELLIS, B. Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica. Presentación de 9 casos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, 14:7-15, 1996.
- REILLY, A. Prevention and control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: Memorandum from a WHO meeting. **Bulletin of the world Health Organization**, 76:245-455, 1998.
- RIOS, M.; PRADO, V.; TRUCKSIS, M.; ARLLANO, C.; BORIE, C.; ALEXANDRE, M.; FICA, A.; LEVIEN, 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.
- ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. **EMBO J.**, 11:3551-3560, 1992.
- SALYERS, A.A. & WHITT, D.D. – Bacterial pathogenesis, a molecular approach, **United States, ASM Press**. 16: 190-204, 1994.
- SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C.; LEVINE, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, 87:1450-1455, 1991.
- SCALETSKY, I.C.A.; MILANI, S.R.; TRABULSI, L.R.; TRAVASSOS, L.R. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 56:2979-2983, 1988.
- SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. **Infect. Immun.**, 63:1055-1061, 1995.
- SCHMIDT, H.; BITZAN, M.; KARCH, H. Pathogenic aspects of STEC infections in humans. En: Verotoxigenic *E. coli*. Eds. Duffy G.; Garvey, P.; McDowell, A. **Food and Nutrition Press. USA**: 241-262, 2001.
- SCHULTSZ, C.; POOL, G.J.; van KETEL, R.; de WEVER, B.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stools samples by

using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 32:2393-2397, 1994.

- SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Review**, 60:167-215, 1996.
- SERIWATANA, J.; ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D.N.; RASRINAUL, L.; BROWN, J.E.; PEIRIS, J.S.M.; CLAYTON, C.L. Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. **Infect. Immun.**, 56:1158-1161, 1988.
- SHARIFF, M.; BHAN, M.K.; KNUTTON, S.; DAS, B.K.; SAINI, S.; KUMAR, R. Evaluation of the fluorescence actin staining test for detection of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 61:386-389, 1993.
- SLUTSKER, L.; RIES, A.A.; GREENE, K.D.; WELLS, J.G.; HUTWAGNER, L.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. **Ann. Intern. Med.**, 126:55-513, 1997.
- SOJKA, W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. **Review Series of the Commonwealth. Bureau of Animal Health, Weybridge, UK.**, 104-156, 1965.
- SPERANDIO, V.; KAPER, J.B.; BORTOLINI, M.R.; NEVES, B.C.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. **FEMS. Microbiol. Lett.**, 164:133-139, 1998.
- SU, C.; BRANDT, L.J. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. **Ann. Intern. Med.**, 123:698-714, 1995.
- SUSSMAN, M. (Ed.). *Escherichia coli*: Mechanisms of virulence. **Cambridge University Press, UK.**, 1997.
- TARR, C.L.; WHITTAM. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, 184:479-487, 2002.
- TESH, V.L.; O'BRIEN, A.D. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and Shiga-like toxins. **Mol. Microbiol.**, 5: 1817-1822, 1991.
- THOMPSON, M.R. *E. coli* heat-stable enterotoxins and their receptors. **Pathol. Immunopathol. Res.**, 6: 103-116, 1987.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 76:4350-4354, 1979.
- TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Em. Infect. Dis.**, 8:508-512, 2002.

- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4. ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
- UGRINOVICH, L.A.; DE ÁVILA, F.A.; OLIVEIRA, M.N.; CASTRO, A.F.P. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 32:289-291, 2002.
- VIEIRA, M.A.M.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.P.; DIAS, A.M.G.; RAMOS, S.R.T.S.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. *The J. Infect. Dis.*, 183:762-772, 2001.
- WHIPP, S. C. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.*, 58:930-934, 1990.
- WHIPP, S.C.; RASMUSSEN, M.A.; CRAY Jr, W.C. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *J. Am. Med. Assoc.*, 204:1168-1175, 1994.
- WIELER, L.H.; BAUERFEIND, R.; BALJER, G. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl. Bakteriolog.*, 276:243-253, 1992.
- WIELER, L.H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J. Clin. Microbiol.*, 34(12):2980-2984, 1996.
- WIELER, L.H.; SCHWANITZ, A.; VIELER, E.; BUSSE, B.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J.B.; BALJER, G. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *Infect. Immun.*, 36: 1604-1607, 1998.
- WIELER, L.H.; BUSSE, B.; STEINRUCK, H.; BEUTIN, L.; WEBER, A.; KARCH, H.; BALER, G. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serogroup O118 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 38:2162-2169, 2000.
- WILLSHAW, G.A.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli*. En *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. **Cambridge University Press**:421-448, 1997.
- WOODWARD, M.J.; GAVIER-WIDEN, D.; MCLAREN, I.M.; WRAY, C.; SOZMEN, M.; PEARSON, G.R. Infection of gnotobiotic calves with *Escherichia coli* O157:H7 strain A84. *Vet. Rec.*, 144:466-470, 1999.

- YAMAMOTO, T. & NAKAZAWA, M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, 35:223-227, 1997.
- YAMAMOTO, T.; WAKISAKA, N.; SATO, F.; KATO, A. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 147:89-95, 1997.
- YAMAMOTO, T.; TANEIKE, I. The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. **FEBS Letters**, 472:22-26, 2000.
- ZHANG, W.L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, 40:4486-4492, 2002.

XIII - ANEXOS

Anexo 1: Principais resultados obtidos em testes de PCR, com as amostras isoladas, em relação à pesquisa dos genes que codificam para *eae*, EAF, BFP, Stx, LT, ST, CNF, Ehly, subtipos de intimina, inserção de LEE, adesão, sorotipo e testes de FAS e Western blot.

Amostra	<i>eae</i>	EAF	BFP	Stx	LT	ST	CNF geral	Ehly	Inti- mina	Inserção <i>selC</i>	Inserção <i>phcU</i>	Adesão	Sorotipo	FAS	WB	Ehly
128MB (5)	+	-	-	1,2	-	-	-	+	ϵ	intacto	intacto	LAL	O7:H10	+	+	-
128MB (6)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	Lise	O7:H10	I	I	α
Mora (1)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	Lise	O132:H51	I	I	-
Mora (2)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interromp	EA	O111:H-	-	-	+
Mora (5)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	EA	O132:H51	I	I	-
Mora (8)	+	-	-	1	-	-	-	+	NT	intacto	intacto	EA	ONT:H8	-	Nt	+
Mora (17)	+	-	-	1	-	-	-	-	NT	intacto	interromp	EA	O132:H51	+	-	-
Mora (4)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interromp	EA	O111:H-	-	+	+
Ficha (1)	+	-	-	1	-	-	-	+	NT	intacto	interromp	AD	O10:H51	-	Nt	+
Ficha (4)	+	-	-	1	-	-	-	-	$\gamma 2$	intacto	intacto	AD	O127:H40	+	+	-
Ficha (5)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interromp	AD	O111:H-	+	+	+
Beleza (2)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interromp	LAL	O111:H-	+	Nt	+
Beleza (3)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interromp	LAL	O111:H-	+	+	+
Beleza (4)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interromp	NC	O111:H-	+	+	+
937BG (12)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\beta 1$	intacto	interromp	LAL	O118:H16	+	Nt	+
Florinda (19)	+	-	-	-	-	-	-	-	ϵ	intacto	interromp	LAL	O80:H26	+	Nt	-
Florinda (16)	+	-	-	-	-	-	-	+	$\beta 1$	intacto	interromp	LAL	ONT:H11	+	Nt	+
73CC (11)	+	-	-	-	-	-	-	-	β	intacto	interromp	NC	O86:H36	-	Nt	.
Elga (5)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	AD	O119:H-	I	I	-
Elga (2)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	EA	O119:H-	I	I	-
129MB (2)	+	-	-	1,2	-	-	-	+	ϵ	intacto	interromp	LAL	O123:H2	+		+
129MB (3)	-	-	-	1,2	-	-	-	-	I	I	I	NC	O123:H2	I	I	-
132MB (9)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	AD	O123:H2	I	I	+

Anexo 1: continuação

Amostra	<i>eae</i>	EAF	BFP	Stx	LT	ST	CNF geral	<i>Ehly</i>	Intimina	Inserção <i>selC</i>	Inserção <i>pheU</i>	Adesã o	Sorotipo	FAS	WB	<i>Ehly</i>
102MB (9)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	EA	O113:H21	I	I	-
102MB (11)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	EA	ONT:H8	I	I	-
92MB (4)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	NC	O119:H-	I	I	-
92MB (5)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	NC	O153:H12	I	I	-
92MB (6)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	NC	O119:H-	I	I	-
92MB (7)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	NC	ONT:H-	I	I	-
92MB (9)	-	-	-	1	-	-	1,2	-	I	I	I	NC	O119:H-	I	I	-
151MB (3)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	NC	O175:H49	I	I	-
151MB (13)	-	-	-	1,2	-	-	-	-	I	I	I	NC	O7:H10	I	I	-
78CC (22)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	EA	ONT:H18	I	I	+
78CC (26)	-	-	-	1,2	-	-	-	-	I	I	I	C S	O98:H49	I	I	-
004HV (5)	+	-	-	-	-	-	-	+	$\beta 1$	intacto	interrom	EA	ONT:H11	+	Nt	+
002SB (1)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	NC	O111:H-	+	+	+
002SB (11)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	NC	O111:H-	+	+	+
002SB (14)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	NC	O111:H-	+	+	+
001HV (2)	+	-	-	1	-	-	-	+	NT	N.A.B.	intacto	LAL	O8:H21	+	-	+
001HV (5)	+	-	-	1	-	-	-	-	NT	intacto	interrom	EA	O116:H20	+	Nt	-
002HV (4)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	LAL	O111:H-	+	+	+
002HV (1)	+	-	-	1	-	-	-	+	ζ	intacto	interrom	NC	O7:H?	+	+	+
002HV (10)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	NC	O111:H-	+	+	-
002HV (5)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	NC	O111:H19	+	+	+
41CC (5)	+	-	-	-	-	-	-	-	NT	intacto	intacto	NC	O123:H36	+	-	-
43CC (2)	+	-	-	-	-	-	-	+	μ	intacto	interrom	NC	O123:H?	+	Nt	+
61CC (7)	+	-	-	1	-	-	-	+	$\gamma 2$	intacto	interrom	NC	O111:H-	+	+	+
65CC (3)	+	-	-	-	-	-	-	+	$\beta 1$	N.A.B.	interrom	LAL	O123:H11	+	Nt	+
34CC (3)	+	-	-	-	-	-	-	+	$\beta 1$	N.A.B.	interrom	-	O123:H11	I	Nt	+

Anexo 1: continuação

Amostra	<i>eae</i>	EAf	BFP	Stx	LT	ST	CNF geral	<i>Ehly</i>	Intimina	Inserção <i>selC</i>	Inserção <i>pheU</i>	Adesão	Sorotipo	FAS	WB	<i>Ehly</i>
36CC (1)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	N.A.B.	interrom	LAL	O123:H11	+	Nt	+
36CC (4)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	N.A.B.	interrom	LAL	O123:H11	-	Nt	+
40CC (6)	+	-	-	-	-	-	-	-	NT	intacto	interrom	AD	O8:H25	-	-	-
034BG (2)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	N.A.B.	interrom	NC	O123:H11	-	Nt	+
15F (11)	+	-	-	-	-	-	-	-	β1	N.A.B.	intacto	EA	O21:H25	+	Nt	-
15F (26)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	intacto	intacto	NC	O177:H11	-	Nt	+
20F (1)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	N.A.B.	interrom	NC	O26:H11	+	Nt	+
21F (7)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	intacto	interrom	-	O177:H11	-	Nt	+
9F (17)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	intacto	intacto	-	O177:H11	I	Nt	+
14F (2)	+	-	-	-	-	-	-	-	NT	intacto	intacto	EA 6h	NT:H-	+	Nt	-
18F (19)	+	-	-	-	-	-	-	-	β1	intacto	intacto	LAL	O177:H11	-	Nt	-
6CP (8)	-	-	-	1	-	-	2	+	I	I	I	AD	O119:H-	I		+
28CP (15)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O17:H18	I	I	+
7 J (15)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O?:H25	I	I	+
30F (5)	+	-	-	-	-	-	-	+	β1	N.A.B.	intacto	-	O26:H11	+	Nt	+
Catita (8)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	-	O26:H11	I	I	-
1FC(1)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O60:H19	I	I	+
3FC(4)	-	-	-	1,2	-	-	-	-	I	I	I	-	O103:H7	I	I	-
8FC(1)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O123:H36	I	I	+
19FC(15)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	-	O?:H?	I	I	-
21FC(19)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	-	O7:H7	I	I	-
9FB(17)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	-	O8:H?	I	I	-
10FB(19)	-	-	-	1,2	-	-	-	-	I	I	I	-	O?:H?	I	I	-
16FB(12)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	EA	O55:H19	I	I	-
4FG(1)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	NC	O119:H8	I	I	-
9FG(9)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	NC	O88:H8	I	I	-
1997(2)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	NC	O174:H21	I	I	-
1978(8)	-	-	-	1	-	-	-	-	I	I	I	-	O?:H	I	I	-
N70(4)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	Lise	O11:H	I	I	α
2094(2)	+	-	-	2	-	-	-	+	ζ	<i>selC</i> intacto	<i>pheU</i> interromp	-	O49:H-	-	Nt	+
1993 (1)	-	-	-	1	-	-	-	+	I	I	I	-	O22:H16	I	I	+
41 (12)	+	-	-	-	-	-	-	+	NT	N.A.B.	<i>pheU</i> interromp	LAL	O145:H	+	Nt	+
N68(9)	-	-	-	1	-	-	2	-	I	I	I	Lise	O11:H	I	I	α

Anexo 1: continuação

Amostra	<i>eae</i>	EAF	BFP	Stx	LT	ST	CNF geral	<i>Ehly</i>	Intimina	Inserção <i>selC</i>	Inserção <i>pheU</i>	Adesão	Sorotipo	FAS	WB	<i>Ehly</i>
N61(12)	-	-	-	1	-	-	-	+	I	I	I	Lise	O22:H16	I	I	+
N61(8)	-	-	-	1,2	-	-	2	+	I	I	I	-	O7:H7	I	I	+
N46(7)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O48:H7	I	I	+
2098(1)	-	-	-	1	II	-	-	-	I	I	I	-	O64:H	I	I	-
32(5)	+	-	-	1	-	-	-	+	γ 2	<i>selC</i> intacto	<i>pheU</i> interromp	LAL	O111:H8	+	Nt	+
Palestina (5)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O22:H16	I	I	+
16 (5)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O22:H16	I	I	+
N44(14)	+	-	-	2	-	-	-	+	NT	<i>selC</i> intacto	<i>pheU</i> interromp	LAL	O111:H8	+	Nt	+
N62 (14)	-	-	-	1	-	-	-	+	I	I	I	AD	O178:H19	I	I	+
N62 (15)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	AD	O174:H21	I	I	-
N56 (9)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	-	O178:H19	I	I	+
2089(8)	-	-	-	2	-	-	-	-	I	I	I	-	O174:H21	I	I	-
9FC(19)	-	-	-	1,2	-	-	-	-	I	I	I	-	O103:H21	I	I	-
5FC(4)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	NC	O22:H11	I	I	+
12FC(1)	-	-	-	1,2	-	-	-	+	I	I	I	EA	O22:H11	I	I	+
20FG (1)	+	-	-	-	-	-	-	-	β 1	I	I	LAL	O26:H11	I	I	-

NT – Não tipável

N.A.B. – Não apresentou bandas

Nt - Não testado

NC – Aderência Não Característica

LAL – Aderência “Localizada-like”

EA – Aderência Agregativa

AD – Aderência Difusa

CS – Aderência do tipo “cover-slip”

- - Negativo

I - Inviável