Métodos moleculares aplicados na pesquisa de *Escherichia coli* O157 em amostras fecais de bovinos

Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Helena Matté

São Paulo
2004

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

Aos meus pais,
Maria Cecilia e João Carlos.
Ao Roberto.
Pelo amor, companheirismo e
apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Prof[a]. Dr[a]. Maria Helena Matté, pela orientação e dedicação que permitiram a realização deste trabalho;

Às colegas do Laboratório de Saúde Pública pelo apoio nas atividades laboratoriais, especialmente Márcia Castejón, Marisa Morita, Milena Dropa e Miriam Lopes Silva;

À Dr[a]. Lúcia Baldassi pelo provimento da cepa de *E. coli* ATCC;

Aos docentes e funcionários do Departamento de Práticas de Saúde Pública;

Ao CECOVISA/USP – Centro Colaborador em Vigilância Sanitária/Faculdade de Saúde Pública

Convênio CA nº 06/99-44-ANVS/MS, processo nº 2001.1.1048.6.9

RESUMO

Figueiredo VCF. **Métodos moleculares aplicados na pesquisa de *Escherichia coli* O157 em amostras fecais de bovinos.** São Paulo; 2004. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

O grupo das *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) foi assim classificado após a identificação do sorotipo O157:H7 como patógeno nos EUA, em 1982. Este sorotipo foi isolado em dois grandes surtos de colite hemorrágica (CH) associados à ingestão de hambúrgueres. É considerado causa emergente de doença de transmissão alimentar, ocasionando quadros de diarréia branda à severa (sanguinolenta), podendo evoluir para um quadro de insuficiência renal ocasionalmente fatal, denominado síndrome hemolítica urêmica (SHU). O gado bovino saudável tem sido apontado como o principal reservatório de EHEC e o conteúdo fecal destes animais pode contaminar a carne durante o abate, bem como os equipamentos utilizados neste processo. A infecção também pode ocorrer pela ingestão de leite cru e derivados não pasteurizados, embutidos, vegetais e água contaminada. O contágio pessoa a pessoa também é um importante modo de transmissão. **Objetivo.** Aplicação de métodos moleculares, visando caracterizar *Escherichia coli* sorogrupo O157, em isolados obtidos de amostras fecais de bovinos. **Métodos.** Amostras fecais de 44 bovinos sadios foram colhidas em matadouro com serviço de inspeção oficial e em propriedades de exploração leiteira. As amostras foram enriquecidas em caldo EC e semeadas em meio de cultura específico (Fluorocult®, Merck). As colônias sorbitol-negativo, MUG-negativo e oxidase-negativa foram testadas com anti-soro específico (soro anti *E.coli* O157®, Probac). Os isolados obtidos foram submetidos a técnicas moleculares (PCR e RSS-PCR) utilizando iniciadores específicos para o microrganismo em estudo. **Resultados.** Os resultados não confirmaram a presença do sorogrupo O157 nas amostras pesquisadas mas evidenciaram que as técnicas moleculares empregadas foram capazes de evidenciar e caracterizar a cepa padrão *E. coli* O157H:7, podendo assim,

serem utilizadas como ferramentas para a identificação de amostras do sorogrupo O157, possibilitando um diagnóstico específico, de fácil execução e pouco dispendioso.

Descritores: Saúde Pública. Microbiologia. PCR. *Escherichia coli.*

SUMMARY

Figueiredo VCF. **Métodos moleculares aplicados na pesquisa de *Escherichia coli* O157 em amostras fecais de bovinos** [Molecular methods applied to the study of *Escherichia coli* O157 in bovine feces]. São Paulo (BR); 2004. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a group of bacteria classified after the identification of serotype O157:H7 as a pathogen in the USA, in 1982. This serotype was isolated in two large outbreaks of hemorrhagic colitis (HC) associated with hamburgers. It is considered an emerging foodborne disease, leading to cases of mild to severe (bloody) diarrhea that may evolue into occasionally fatal cases of renal insufficiency, called hemolytic uremic syndrome (HUS). Healthy cattle are believed to be the main reservoirs of EHEC and fecal contents of these animals may contaminate meat and equipment during slaughter. Infection may also occur by means of the ingestion of raw milk and unpasteurized milk by-products, contaminated sausages, vegetables and water. Person-to-person contagion is also an important route of transmission. **Objective.** The objective of the present trial was the use of molecular methods in order to characterize *Escherichia coli* serogroup O157 in isolates obtained from bovine feces. **Methods.** Fecal samples from 44 healthy bovines were collected in a slaughterhouse submitted to official inspection and in dairy farms. Samples were enriched in EC broth and cultured in specific culture medium (Fluorocult®, Merck). Colonies that were sorbitol-negative, MUG-negative and oxidase-negative were tested against specific anti-serum (serum anti *E.coli* O157®, Probac). Isolates obtained were submitted to molecular techniques (PCR and RSS-PCR) using primers specific for the microorganism. **Results.** The presence of serogroup O157 was not confirmed in the samples analyzed. Molecular techniques evidenced and characterized the standard strain *E. coli* O157:H7 used as positive control, and may, therefore, be used as tools in the

identification of serogroup O157, enabling specific, easy and cheap diagnostic procedure.

Descriptors: Public Health. Microbiology. PCR. *Escherichia coli.*

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) 4
1.2 Aspectos Epidemiológicos 7
1.2.1 Relato de surtos 10
1.2.2 Reservatório / gado bovino 19
1.3 Identificação Laboratorial 28
1.3.1 Características fenotípicas 28
1.3.2 Características genotípicas 28
2 OBJETIVOS 37
3 MÉTODOS 38
3.1 Amostragem 38
3.2 Análise Microbiológica 38
3.3 Sorologia 39
3.4 Técnicas Moleculares 39
3.4.1 Extração do DNA Genômico 40
3.4.2 Confirmação do sorogrupo O157 – Ensaio da PCR 41
3.4.3 Eletroforese em gel de agarose 42
3.4.4 Ensaio de RSS-PCR / *Fingerprinting* 43
3.4.5 Eletroforese em gel de agarose 44
3.4.6 Análise dos perfis genômicos – *fingerprint* 44
4 RESULTADOS 45
5 DISCUSSÃO 51
6 CONCLUSÕES 60
7 REFERÊNCIAS 61
8 ANEXOS
Anexo 1 – Meios de Cultura ..... AI
Anexo 2 – Prova da Oxidase ..... AIII
Anexo 3 – Reagentes para Eletroforese ..... AIV

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sorogrupos/sorotipos de *E. coli* patogênicos para o homem 3

Quadro 2: Sinais e sintomas das enfermidades relacionadas com *E. coli* 3

Quadro 3: Sorotipos de *E. coli* produtores de Verotoxinas (STEC não-O157:H7) 9

Quadro 4: Iniciadores utilizados no multiplex PCR para detecção de *E. coli* O157, segundo FRATAMICO e col. (1995) 30

Quadro 5: Iniciadores utilizados no multiplex PCR, segundo CEBULA e col. (1995) 30

Quadro 6: Iniciadores utilizados no multiplex PCR, segundo PATON e PATON (1998) 32

Quadro 7: Iniciadores utilizados no mPCR para detecção de *E. coli* O157:H7, segundo HU e col. (1999) 33

Quadro 8: Iniciadores utilizados na PCR para detecção do sorogrupo O157, segundo DESMARCHELIER e col. (1998) 34

Quadro 9: Iniciadores utilizados na PCR para detecção do sorogrupo O157, segundo MAURER e col. (1999) 35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características de colônias de *E. coli* semeadas em meio Fluorocult®, após incubação a 37°C por 24 horas... 46

Figura 2: Percentual de isolados positivos na sorologia com anti-soro *E. coli* O157. 46

Figura 3: Imagem do gel de agarose dos isolados presuntivos de *E. coli* O157, submetidos ao ensaio da PCR, conforme descrito por MAURER e col. (1999) (modificado). 47

Figura 4: Imagem do gel de agarose 1,8% contendo os diferentes fragmentos obtidos a partir do RSS–PCR, segundo KIMURA e col.(2000), de cepas de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de bovinos, 2002. 49

Figura 5: Representação gráfica da matriz de similaridade de Pearson dos fragmentos obtidos por RSS-PCR, segundo KIMURA e col. (2000), de cepas de *E. coli* isoladas de fezes de bovinos, 2002. 50

1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é um microrganismo da família *Enterobacteriaceae*. Bacilo Gram-negativo, catalase-positivo, oxidase-negativo e anaeróbico facultativo, é um habitante praticamente universal do intestino do homem e dos vertebrados. Foi isolado pela primeira vez em 1885 pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich das fezes de crianças com gastroenterite. Apesar de muitas cepas serem consideradas como um comensal inofensivo, outras são capazes de causar manifestações clínicas no homem ocasionando geralmente infecções no trato intestinal, urinário, podendo também causar septicemia e meningite (ADAMS e MOSS, 1995).

As várias cepas de *E. coli* diferenciam-se sorologicamente com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Atualmente são conhecidos cerca de 170 diferentes antígenos O, determinando assim o sorogrupo. A combinação específica entre antígenos O e H define o sorotipo (NATARO e KAPER, 1998).

As *E. coli* consideradas patogênicas para o homem são agrupadas em seis classes, com base em observações epidemiológicas, manifestações clínicas e nos fatores de virulência, conforme classificação abaixo:

- EPEC (*Escherichia. coli* enteropatogênica)
- EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva)
- ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica)
- EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica)
- EAggEC (*Escherichia coli* enteroagregativa)
- DAEC (*Escherichia coli* difusamente aderente)

A classe das *E. coli* EAggEC foi identificada recentemente, com ainda poucos dados disponíveis e tem sido freqüentemente isolada de indivíduos imunossuprimidos com quadros de diarréia persistente, muitos deles HIV-positivos (GERMANI e col., 1998).

A classe denominada *E. coli* difusamente aderente (DAEC) tem sido citada associada à surtos esporádicos de diarréia, embora seu envolvimento ainda não tenha sido esclarecido (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Nos dois quadros abaixo estão apresentados os principais sorogrupos de *E. coli* patogênica e os sinais e sintomas conseqüentes aos mesmos (Quadros 1 e 2).

Quadro 1: Sorogrupos / sorotipos de *E. coli* patogênicos para o homem.

Classificação	sorogrupo / sorotipo
EPEC	O18, O44, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142
EIEC	O28ac, O29, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167
ETEC	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128c, O139, O148, O153, O159, O167
EHEC	O26H:11, O111:NM, O103:H2, O113:H21, O157:H7
EAggEC	não definido

Fonte: Adaptado de ICMSF, 1996.

Quadro 2: Sinais e sintomas das enfermidades relacionadas com *E. coli*.

Tipo de *E. coli*	Período de Incubação	Duração	Sintomas
ETEC	17– 22 h (x= 36 h)	6 h – 3 dias	Náusea, vômito, febre, calafrios, dor abdominal, diarréia aquosa com presença de muco e raramente sangue
EIEC	8 – 24 h (x= 11 h)	dias a semanas	Febre, calafrios, mal estar, cefaléia, diarréia aquosa, cólicas abdominais intensas
ETEC	8 – 44 h (x= 26 h)	3 – 19 dias	Náusea, vômito, cólicas, diarréia aquosa intensa, mal estar, febre baixa ou afebril; na forma mais grave, quadro semelhante ao cólera
EHEC	3 – 9 dias (x= 4 d)	2 – 9 dias	Diarréia com sangue (colite hemorrágica), vômito, ausência de febre, dor abdominal intensa, pode evoluir para SHU, insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica

Fonte: ICMSF, 1996.

1.1 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

A classificação de algumas cepas de *Escherichia coli* em uma classe distinta de *E. coli* patogênica, denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi baseada em duas observações epidemiológicas.

A primeira foi o relato de RILEY e col. (1983) sobre o isolamento de um raro sorotipo a partir da investigação de dois surtos de doença gastrointestinal incomum ocorridos em 1982, associados ao consumo de sanduíches em uma mesma cadeia de lanchonetes. Foram acometidas 47 pessoas nos estados americanos de Oregon (26 doentes e 19 hospitalizações) e Michigan (21 doentes e 14 hospitalizações). Todos os enfermos (100%) apresentavam fortes cólicas abdominais, diarréia inicialmente aquosa evoluindo para intensamente hemorrágica, alguns apresentaram náuseas (63%), vômitos (47%), calafrios (30%) e febre (7%). O período de duração da doença variou entre 2 e 9 dias. Houve isolamento de *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 em amostras de fezes dos pacientes e em uma amostra de hambúrguer de uma lanchonete em Michigan.

A segunda foi o relato, também em 1983 de KARMALI e col. (1983a), associando casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU) com citotoxinas de *E. coli* presentes nas amostras fecais dos pacientes. Esta pesquisa foi considerada, por gastroenterologistas e nefrologistas, como relevante contribuição científica. O ensaio de citotoxicidade utilizado por Karmali foi originalmente realizado por KONOWALCHUK e col. (1977), que

demonstraram que algumas cepas de *E. coli* produziam uma toxina que causava um notável e irreversível efeito citopático em células Vero (células renais de macaco verde africano); sendo totalmente distinta das toxinas LT (termo-lábil) e ST (termo-estável) das linhagens de ETEC e então chamaram-na de Verotoxina (VT).

Na mesma época O'BRIEN e col. (1980) relatam que alguns extratos de certas linhagens de *E. coli* eram citotóxicos para células HeLa (células de carcinoma epitelióide cervical humano) e esta atividade citopática podia ser neutralizada pela anti-toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, denominando-a como "Shiga-like toxin" (SLT).

Em 1983 O'BRIEN e col. demonstraram que a "Shiga-like toxin" (SLT) e a Verotoxina (VT) descrita por Konowalchuk e Karmali eram a mesma toxina e que as cepas O157:H7 descritas por Riley produziam esta toxina.

KARMALI e col. (1983b) concluiram que a VT e a SLT eram um fator de virulência comum entre as bactérias que causavam colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU), e eram responsáveis pelos danos aos tecidos intestinais e renais.

Os termos *E. coli* verotoxigênica, *E. coli* produtora de Verocitotoxina (VTEC) e *E. coli* produtora de "Shiga-like" toxina (STEC ou SLTEC), todos aceitos pela comunidade científica, são equivalentes e referem-se às cepas de *E. coli* que produzem uma ou mais toxinas da família de SLT ("Shiga-like" toxina). Nem todos os sorotipos de STEC são considerados patogênicos; enquanto que o termo EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) descreve um

subgrupo de STEC e implica uma conotação clínica, sendo utilizado para as cepas consideradas patogênicas ao homem, que causam colite hemorrágica (CH) ou síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO e KAPER, 1998). Estes autores ainda propuseram os termos "EHEC típica" para os sorotipos de STEC que produzem SLT, causam uma lesão característica denominada "attaching and effacing" (A/E) em células epiteliais intestinais e possuem plasmídeo de 60 M-Da (como O157:H7); e "EHEC atípica" para as cepas que não produzem lesões A/E e/ou não possuem o plasmídeo de 60 M-Da.

Existem dois tipos de verotoxinas denominadas de verotoxina 1 (VT 1) e verotoxina 2 (VT 2). A VT 1 é estruturalmente e imunologicamente semelhante à toxina Shiga (SLT 1), podendo ser neutralizada pela antitoxina Shiga (ICMSF 1996).

Desse modo VT 1 ou SLT 1 e VT 2 ou SLT 2 podem ser assim denominadas, sendo também aceitos os termos Stx1 e Stx2 ("Shiga toxin"). Enquanto Stx1 é altamente conservada, existem variações na seqüência dentro das Stx2. As diferentes variantes são designadas Stx2e, Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2y, etc. A estrutura das Stx é formada por uma subunidade A (32kDa) e um pentâmero com 5 subunidades B (7,7 kDa) idênticas, totalizando um peso molecular de 70 kDa. O modo de ação ocorre quando a subunidade B se liga a um receptor de membrana glicolipídeo específico, presente em células eucarióticas, denominado globotriosilceramídeo (Gb_3) ou globotetrasilceramídeo (Gb_4) e a toxina é então endocitada. Forma-se uma vesícula que através de transporte retrógrado via complexo de Golgi

chega ao retículo endoplásmico onde a subunidade A ocasiona inibição da síntese protéica e em último estágio, morte celular. Os danos do epitélio intestinal pela ação de Stx, e outros mediadores inflamatórios também podem ajudar na translocação da toxina para a corrente sangüínea, podendo assim atingir o tecido renal (O'LOUGHLIN e ROBINS-BROWNE, 2001).

1.2 Aspectos Epidemiológicos

Após o reconhecimento da *E. coli* O157:H7 como microrganismo patogênico de transmissão alimentar, surge a dúvida se ele seria realmente emergente ou se sempre esteve presente e não estava sendo diagnosticado. O Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC/USA) então revisou 3.000 isolamentos *de E. coli* sorotipados entre 1973 e 1983 e encontrou apenas uma cepa O157:H7 (RILEY e col., 1983).

No Reino Unido, o Laboratório Nacional de Saúde Pública encontrou apenas um isolamento do sorotipo O157:H7 dentre as 15.000 cepas de *E. coli* sorotipadas entre 1978 e 1982 (DAY e col., 1983).

No Canadá entre 1978 e 1982, dos 2.000 isolados de *E. coli* em pacientes com diarréia, somente seis cepas foram classificadas como O157:H7 (JOHNSON e col., 1983).

Essas revisões de cepas de *E. coli* isoladas anteriormente ao isolamento do sorotipo O157:H7, sugerem que a incidência do sorotipo O157:H7 realmente tenha aumentado nas duas últimas décadas. O CDC

estima que anualmente ocorram nos EUA 73.000 casos de infecção por *E. coli* O157:H7, com 2.100 hospitalizações e 61 casos fatais (CDC 2000).

Além da América do Norte, as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) são um importante grupo de patógenos na Europa, Japão, África do Sul, Austrália, Chile e Argentina. Nos países do hemisfério Norte pode-se distinguir uma sazonalidade da infecção com maior ocorrência de casos no verão (NATARO e KAPER, 1998).

Outros sorotipos além do O157:H7 foram associados com diarréia sanguinolenta ou com a SHU, dentre eles destacam-se os sorotipos O26:H11, O103:H2, O111:NM e O113:H21 (GRIFFIN e TAUXE, 1991).

Suspeita-se que de 20 a 25% dos casos de SHU na América do Norte estejam relacionados às EHEC não-O157:H7 (JOHNSON e col.,1996). Em muitos países como Argentina, Chile e Austrália os sorotipos não-O157:H7 são responsáveis pela maior parte dos casos de SHU (LOPEZ e col., 1989; GOLDWATER e BETTELHEIM, 1994; OJEDA e col.,1995).

Apesar disso, em dois estudos caso-controle foram isolados sorotipos STEC não-O157:H7 na mesma proporção nos indivíduos doentes e nos controles (BROWN e col., 1989; PATON e col., 1993).

Portanto ainda não é conhecido o real significado do isolamento de STEC não-O157:H7 em amostras de fezes humanas e além disso muitos estudos mostram uma elevada taxa de isolamento destes sorotipos em

produtos cárneos (SAMADPOUR e col., 1994), o que possivelmente ocasionaria o aparecimento de um elevado número de indivíduos doentes caso todos esses sorotipos fossem patogênicos (NATARO e KAPER, 1998).

Mais de 60 sorotipos de *E. coli* produzem SLTs (Stxs), conforme quadro abaixo (Quadro3).

Quadro 3: Sorotipos de *E. coli* produtores de Verotoxinas (STEC não-O157:H7).

O1:NM	O2:H5	-O2:H7	O4:NM	O4:H10	O5:NM	O5:H6
O6:H1	O18:NM	O18:H7	O25:NM	O26:NM	O26:H11	O26:H32
O38:H21	O39:H4	O45:H2	O50:H7	O55:H7	O55:H10	O82:H8
O84:H2	O91:NM	O91:H21	O103:H2	O111:NM	O111:H8	O111:H30
O111:H34	O113:H7	O113:H21	O114:H48	O115:H10	O117:H4	O118:H12
O118:H30	O121:NM	O121:H19	O125:NM	O125:H8	O126:NM	O126:H8
O128:NM	O128:H2	O128:H8	O128:H12	O128:H25	O145:NM	O145:H25
O146:H21	O153:H25	O157:NM	O163:H19	O165:NM	O165:H9	O165:H25

Fonte: KARMALI, 1989.

1.2.1 Relato de surtos

A doença aguda causada por *E. coli* O157:H7 recebe o nome de colite hemorrágica (CH). Os sintomas predominantes são diarréia aguda evoluindo para diarréia sangüinolenta, intensas dores abdominais e ausência de febre. O período de incubação varia entre 3 e 9 dias (4 dias em média) e a duração da doença varia de 2 a 9 dias, mas pode haver evolução para um quadro grave, denominado síndrome hemolítica urêmica (SHU) caracterizado por insuficiência renal aguda, anemia hemolítica e trobocitopenia (US.FDA 2001).

O mecanismo de patogenicidade ainda não foi esclarecido totalmente, parece que inicialmente ocorre colonização no intestino grosso com posterior produção de toxinas que são ativas no cólon. Todos os isolamentos clínicos produzem Stx1, Stx2 ou ambas (ICMSF 1996).

Ápos a descrição de RILEY e col. (1983) associando *E. coli* O157:H7 ao consumo de hambúrgueres, outro grande surto ocorreu nos EUA, em 1993, também tendo como veículo principal hambúrgueres mal passados servidos por uma cadeia de lanchonetes. Em quatro estados (Washington, Idaho, Nevada e Califórnia) mais de 700 pessoas foram acometidas, 51 pacientes desenvolveram SHU e houve quatro óbitos (CDC 1993).

SALMON e col. (1989) fizeram o primeiro relato de surto de colite hemorrágica no Reino Unido, onde, das 93 pessoas que participaram de uma festa de batizado na cidade de Birminghan em junho de 1987, 26 adoeceram

e seis foram hospitalizadas sendo que uma mulher de 35 anos desenvolveu quadro de SHU. Não houve óbitos. A *E. coli* O157:H7 foi isolada em 13 (53%) de 23 amostras fecais dos pacientes e em 3 (9%) de 33 indivíduos assintomáticos. A doença foi associada ao consumo de sanduíches frios de peru, sugerindo que alimentos frios também podem ser importante fonte de infecção.

Apesar de muitos surtos de *E. coli* O157:H7 serem associados com produtos cárneos mal cozidos, outros tipos de alimentos como leite cru, iogurte, vegetais, salame defumado, maionese e cidra de maçã também foram relacionados. A implicação de alimentos ácidos como veículos de infecção mudou o paradigma de que alimentos com pH baixo seriam seguros (FENG 1995).

Em 1991, nos EUA, um surto de *E. coli* sorotipo O157:H7 acometeu vinte e três pessoas que haviam consumido cidra de maçã não pasteurizada e sem conservantes (pH: 3,7 - 3,9). A fonte de contaminação da cidra não foi estabelecida, mas suspeitou-se que as maçãs recolhidas do chão possam ter sido contaminadas com esterco bovino (BESSER e col., 1993).

MILLER e KASPAR (1994) mostram a viabilidade de *E. coli* O157:H7 por períodos de dez dias a um mês em cidra de maçã com pH $\cong$ 2,0 e sob refrigeração (8°C).

Em outubro de 1996, no oeste dos Estados Unidos, mais três surtos de doença gastrintestinal causada por *E. coli* O157:H7 foram associados

com suco de maçã resultando em 66 pessoas doentes e um óbito (CDC 1997a).

No Reino Unido ocorreu um surto associado ao consumo de iogurte, das 16 pessoas envolvidas, 11 eram crianças. Sendo o sorotipo O157:H7 sensível ao tratamento térmico; produtos lácteos envolvidos em infecções ou foram preparados com leite cru, ou foram contaminados após a pasteurização (MORGAN e col., 1993).

Outros autores mostram que a *E. coli* O157:H7 pode tolerar a acidez produzida durante o processo de fermentação (pH < 4,8) de embutidos e nestes sobreviver mesmo durante o armazenamento a frio e com pouca umidade (GLASS e col., 1992).

Em 1994 ocorreu um surto em Washington relacionado ao consumo de salame defumado, com 20 casos de colite hemorrágica, três hospitalizações; sendo que uma criança desenvolveu SHU. No estudo caso-controle, o salame foi o alimento que apresentou a maior taxa de ataque entre os doentes (68%) e a menor entre os controles (6%) (CDC 1995).

A habilidade do sorotipo O157:H7 em tolerar acidez também foi observada, em 1993, em outro surto acometendo 48 pessoas envolvendo o consumo de maionese (pH 3,6 - 3,9) e molhos à base desta (pH 3,6 - 4,4). Não foi possível determinar como a maionese foi contaminada, mas possivelmente ocorreu manipulação inadequada e contaminação cruzada com produtos cárneos. Estudos mostraram que apesar da *E. coli* O157:H7 não se multiplicar, ela pode sobreviver em maionese comercial mantida a

temperatura de 5°C por mais de 55 dias (WEAGANT e col., 1994; ZHAO e col., 1994).

ABDUL-RAOUF e col. (1993) mostraram a capacidade do sorotipo O157:H7 em sobreviver e multiplicar-se em saladas de vegetais armazenados em temperaturas entre 12°C e 21°C durante mais de 14 dias.

Em 1996 no Japão, o consumo de brotos de rabanete foi associado com o maior surto por infecção de *E. coli* O157:H7 quando aproximadamente 6.000 casos foram notificados (ITOH e col., 1998).

Em 1997 foram relatados em Michigan e Virginia (EUA), os primeiros surtos de *E. coli* O157:H7 associados ao consumo de brotos de alfafa procedentes do mesmo lote de sementes. Foi notificado um total de 60 pessoas com infecção por *E.coli* O157:H7. Diarréia com sangue foi relatada por 44 pessoas (96%) e 24 delas foram hospitalizadas (54%), duas pessoas desenvolveram SHU. Não houve óbito. Os brotos de alfafa são utilizados *in natura* (crus) e podem ter sido contaminados por fezes animais durante a germinação, colheita, processamento, armazenagem ou transporte (CDC 1997b).

Muitos surtos mostraram que a água também pode ser um veículo para a infecção por *E. coli* O157:H7. O primeiro grande surto de transmissão hídrica ocorreu em 1989 no Missouri (EUA) onde mais de duzentas e quarenta pessoas foram infectadas com trinta e duas hospitalizações e quatro mortes. A fonte de contaminação não foi identificada mas provavelmente

tenha ocorrido contaminação por refluxo. Como o sorotipo é sensível ao cloro, ajustes no sistema de cloração durante os reparos no sistema de fornecimento de água potável poderiam ter prevenido o surto (SWERDLOW e col., 1992).

Em 1991 no Oregon (EUA) um surto relacionado a um lago acometeu 59 banhistas. O sorotipo O157:H7 foi isolado em todas as 21 crianças envolvidas. O inquérito epidemiológico mostrou que todos os doentes nadaram no lago e a transmissão possivelmente ocorreu quando os indivíduos engoliram água do lago contaminada por fezes de outros banhistas. O longo período de duração do surto sugere que o sorotipo O157:H7 pode permanecer viável na água por longo tempo ou mesmo que a água estava sendo repetidamente contaminada. Além disso, o fato dos doentes terem ingerido uma pequena quantidade de água do lago, indica que o microrganismo tem uma baixa dose de infecção (KEENE e col., 1994).

Na Escócia, em 1992, também houve um surto envolvendo crianças e relacionado à piscina. Embora epidemiologicamente não conclusivo, os dados sugerem que houve contaminação fecal da água através de uma criança com diarréia que utilizou a piscina. Como a água da piscina não foi trocada ou desinfectada, ela se tornou veículo de transmissão para duas outras crianças que, por sua vez, infectaram outras através de contágio direto (pessoa a pessoa) (BREWSTER e col., 1994).

Em 1999 houve a notificação da ocorrência de surto de *E. coli* O157:H7 em visitantes da "Feira do Condado de Washington". Novecentas e

vinte e uma pessoas que estiveram na feira relataram diarréia. Também foi identificado um surto de *Campylobacter* entre os presentes. Ocorreu o isolamento de *E. coli* O157:H7 em 116 pessoas, 13 delas co-infectadas por *C. jejuni* (32 pessoas tiveram cultura positiva apenas para *Campylobacter*). Sessenta e cinco pessoas foram hospitalizadas, 11 crianças desenvolveram SHU e duas pessoas morreram. Apesar do recinto de exposição possuir água clorada, uma parte das barracas de comida foi abastecida por um poço de água não clorada. Um estudo de caso-controle foi conduzido para determinação da fonte de contaminação, sendo a água do poço, utilizada para o preparo de bebidas e gelo, associada com a doença. A presença de *E. coli* O157:H7 foi demonstrada laboratorialmente na amostra de água do poço (CDC 1999).

Existem três relatos na literatura sobre contaminação ocupacional, quando a infecção por *E. coli* O157:H7 foi adquirida em laboratório, ocorrendo sintomas de colite hemorrágica e desenvolvimento de insuficiência renal (BOOTH e ROWE, 1993; BURNENS e col., 1993; RAO e col., 1996).

Devido a baixa dose de infecção e aos potentes efeitos das toxinas para as células intestinais e renais, as EHEC, no Reino Unido, foram reclassificadas de nível 2 para grupo de risco 3, requerendo as mesmas condições de biossegurança e contenção necessárias ao manuseio de *Salmonella* Typhi e *Shigella dysenteriae* tipo 1 (NATARO e KAPER, 1998).

No Estado de São Paulo a primeira cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada e identificada pelo Instituto Adolfo Lutz em julho de 1997. Esta cepa foi isolada a partir de uma amostra de água de poço proveniente da região de Parelheiros, município de São Paulo (KATSUYA e col., 1998).

No Estado de São Paulo, dos 92 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Estado da Saúde entre 1996 e 1997, em apenas um foi identificado como agente etiológico *E. coli* (1% do total de surtos notificados) e esta não foi soroidentificada (LERNER e KATSUYA, 1998).

Em julho de 2001 dois casos de diarréia com isolamento de *E. coli* sorotipo O157:H7, foram notificados ao CVE. Um dos casos foi o de uma menina de quatro anos de idade, moradora da cidade de Campinas, que em meados do mês de junho apresentou febre (durante 3 dias) e diarréia que evoluiu para sanguinolenta três dias após o início dos sintomas. A criança foi atendida na Casa de Saúde de Campinas e permaneceu hospitalizada por três dias. Não houve desenvolvimento de SHU. O segundo paciente, um jovem de 20 anos, também morador da cidade de Campinas, apresentou quadro inicial leve de diarréia com piora após quatro dias, quando realizou exame de coprocultura. Também apresentou cefaléia e cólicas abdominais e não soube informar sobre presença de sangue nas fezes. Este quadro permaneceu por mais uma semana. O rapaz trabalhava em uma lanchonete onde manipulava alimentos. A Vigilância Sanitária vistoriou o estabelecimento e não encontrou irregularidades. Aparentemente sem apresentar nenhuma

relação entre si, em ambos os casos não foi possível identificar a fonte de contaminação. As amostras de *E. coli* isoladas foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo que realizou a sorotipagem (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE 2001).

IRINO e col. (2002) relatam o primeiro isolamento no Brasil de *E. coli* O157:H7 em amostras clínicas de dois pacientes hospitalizados com quadro de diarréia, no município de Campinas. As amostras foram semeadas em ágar MacConkey e apresentaram reação positiva frente ao anti-soro O157. As cepas foram confirmadas como *E. coli* O157:H7 no laboratório central do Instituto Adolfo Lutz. Nesse mesmo relato, os autores citam o isolamento de uma cepa *E. coli* O157:H7, na análise retrospectiva das 2.573 cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com diarréia, no período de 1976 a 1999, no Estado de São Paulo. A cepa foi isolada em 1990, de um paciente aidético, com quadro de diarréia.

EDUARDO e col. (2003) relatam que o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo registrou, entre 1998 e 2002, 20 casos de SHU, 15 deles com histórico de diarréia aguda precedendo a síndrome. A partir do ano de 2000, o CVE iniciou a implantação do programa de vigilância ativa de patógenos emergentes transmitidos por alimentos. O trabalho ainda descreve a investigação epidemiológica decorrente da notificação pelo Instituto Adolfo Lutz de 2 isolados de *E. coli* O157:H7 em pacientes no município de Campinas. A falta de notificação desses casos pelos médicos, dificultou a investigação epidemiológica e a determinação de

uma fonte comum de transmissão. Na análise das cepas pelo método da eletroforese em campo pulsado (PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) foi evidenciado que ambas apresentaram o mesmo perfil genético, sugerindo uma fonte alimentar comum entre os dois casos.

MEDEIROS e col. (2003), na análise de coproculturas de pacientes aidéticos e com quadro de diarréia, no período de maio a junho de 2003, relataram o isolamento de uma cepa *E. coli* O157:H7, sendo esta a primeira descrição de *E. coli* O157:H7 em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

O contato com animais também foi relatado como fonte de contaminação por EHEC. Durante cinco meses do ano de 1993, ocorreram no norte da Itália quinze casos de SHU causados pelo sorotipo O157 e por outros sorotipos EHEC. Os casos ocorreram em pequenas cidades, distantes umas das outras e aparentemente sem relação entre si, não havia fonte alimentar comum nem exposição a rebanho bovino. O levantamento epidemiológico sugeriu que o contato com frangos vivos ou com gaiolas destes, poderia ter sido a origem da infecção (TOZZI e col., 1994).

SCHOENI e DOYLE (1994) mostraram que a inoculação de *E. coli* O157:H7 em pintos de um dia resultava em uma rápida colonização no ceco e que os animais abrigavam o microrganismo durante longos períodos (até onze meses) e o mesmo podia ser isolado da casca dos ovos.

Resumidamente, como principais aspectos epidemiológicos do grupo EHEC pode-se citar o trato intestinal de vários animais como reservatório

principal, sendo a espécie bovina a mais relevante para a infecção humana, a transmissão através de uma grande variedade de alimentos, a possibilidade de transmissão direta pessoa a pessoa e uma baixíssima dose de infecção permitindo altas taxas de ataque (NATARO e KAPER, 1998).

1.2.2 Reservatório/Gado bovino

E. coli produtoras de toxina "Shiga-like" (STEC) podem ser encontradas na flora intestinal de uma grande variedade de animais, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, suínos, cães, gatos e até em gaivotas. Muitos sorotipos não são classificados como EHEC, pois sua patogenicidade para o homem ainda é desconhecida (GRIFFIN e TAUXE, 1991; BEUTIN e col., 1993; JONHSON e col., 1996; WALLACE e col., 1997).

Elevadas taxas de isolamento de STEC foram encontradas em criações bovinas de diversos países, podendo ser superiores a 60%, mas a principal freqüência variava entre 10 e 25% (WELLS e col., 1991; HANCOCK e col., 1994; BURNENS e col., 1995).

Sorotipos STEC são usualmente isolados de animais sadios, mas eventualmente podem estar associados a episódios de diarréia em animais bem jovens, ocorrendo posterior colonização intestinal assintomática. As taxas de isolamento do sorotipo O157:H7 são muito inferiores às do não-O157:H7 (NATARO e KAPER, 1998).

Em 1987 ØRSKOV e col. revisando cepas de *E. coli* sorogrupo O157, encontraram três isolados característicos do sorotipo O157:H7 dentre 39 cepas isoladas de um grupo de bezerros com sintomas de colibacilose em 1977, na Argentina. As três amostras positivas foram isoladas de um mesmo animal e, quando reexaminadas, produziram verotoxina. As outras 36 cepas eram toxigênicas (ETEC).

O primeiro estudo sobre a ocorrência de VTEC na Alemanha foi realizado através de uma pesquisa em amostras de fezes colhidas assepticamente do cólon de 259 bovinos sadios. Em 28 amostras (10,8%) foi demonstrada a presença de VTEC, sendo o sorotipo O157:H7 isolado em dois animais (MONTENEGRO e col. ,1990).

Um estudo caso-controle com bezerros (197 doentes e 112 controles) em fase de amamentação foi realizado por BLANCO e col. (1993) na região da Galícia, noroeste da Espanha. As amostras foram cultivadas em ágar Mac Conkey sorbitol, testadas com antígeno O e H (quando ocorria sorogrupo O26 e O157). VTEC foi isolada em 21 bezerros sadios (19%) e em 18 que apresentavam diarréia (9%). As cepas isoladas pertenciam a 18 tipos de sorogrupos O, e os mais freqüentes (56%) foram O26, O103, O113 e O157. Das quinze cepas O26, quatorze foram sorotipadas como O26:H11 e das 3 VTEC O157, uma foi O157:H7 e duas O157:NM. Nesta região da Espanha o sorotipo O26:H11 é predominante nos isolamentos de crianças com diarréia. Os autores citam que são 14 os sorogrupos de VTEC de maior ocorrência em

bovinos: O5, O20, O22, O26, O86, O103, O111, O113, O116, O118, O121, O153, O157 e O171.

Em um abatedouro na Inglaterra, na pesquisa por suabe retal em 2103 bovinos, *E. coli* sorogrupo O157 foi isolada em 84 (4%) animais e destes isolamentos, 78 (93%) eram produtores de verotoxina. *E. coli* O157 também foi isolada em sete (30%) das 23 carcaças de animais com suabe retal positivo e em duas (8%) das 25 com suabe retal negativo, mostrando que os bovinos podem ser reservatório da *E. coli* O157, contaminando as carcaças no processo de abate, possibilitando a transmissão do microrganismo para o homem através da carne e seus derivados (CHAPMAN e col., 1993).

Uma pesquisa objetivando estimar a prevalência de *E. coli* O157:H7 em fazendas leiteiras de Wisconsin (EUA) foi realizada entre os meses de março e outubro de 1994. De uma amostra estratificada de 400 propriedades, 70 criações foram selecionadas. Das 560 amostras fecais obtidas, 10 (1,8%) foram positivas para o sorotipo O157:H7. Em uma segunda visita às criações, mais 517 amostras fecais foram testadas e 19 (3,7%) foram positivas. Em 302 amostras ambientais realizadas, também foi constatada a presença de *E. coli* O157:H7 em 3 amostras de água de bebida dos animais, sugerindo que a contaminação da água possa ser uma importante fonte de infecção, contribuindo para disseminar e/ou mesmo manter o sorotipo nas criações. Além disso o estudo cita que a transmissão horizontal também pode ter contribuído para manter a condição de infecção nas propriedades, mas

estudos adicionais seriam necessários para verificar estas observações (FAITH e col., 1996)

CHAPMAN e col. (1997) conduziram um estudo durante o período de um ano no Reino Unido, coletando mensalmente 400 amostras de suabe fecal de bovinos abatidos. *E. coli* O157 foi isolada em 752 (15,7%) das 4.800 amostras — com variação mensal de ocorrência entre 4,8 a 36,8% —, sendo as taxas mais elevadas na primavera e no final do verão. Os autores também obtiveram, neste período de um ano, 3.000 amostras de suabe retal de suínos, ovinos e frangos; isolando *E. coli* O157 em 22 (2,2%) ovinos e em 4 (0,4%) suínos. Não houve isolamento do sorogrupo O157 nos frangos.

Há uma alta prevalência de infecção por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e casos de SHU na Argentina. NOTARIO e col. (2000) pesquisando amostras de suabe retal de 102 animais sadios (68 bovinos e 31 suínos), obtiveram isolamento de EHEC em 44,1% das culturas bovinas e em 58% das suínas. Os genes codificando Stx1 e Stx2 foram observados em 50% dos bovinos e 69,3% dos suínos. Houve isolamento dos sorotipos O26, O111 e O157 nas amostras de bovinos e O111 e O157 nas de origem suína.

Na França, em um estudo prospectivo de um ano, 471 amostras fecais de bovinos sadios enviados ao abate foram investigadas pela técnica da PCR. Trezentas e trinta (70%) amostras foram positivas para presença de genes Stx. Foram isolados cerca de 30 sorotipos em 162 (34%) cepas consideradas STEC, e apenas um pertencia ao sorotipo O157:H7 (PRADEL e col., 2000).

KOBAYASHI e col. (2001) realizaram pesquisa em 358 amostras de fezes coletadas de bovinos sadios (87 bezerros, 88 novilhas e 183 vacas) provenientes de 78 fazendas localizadas na região central do Japão. As amostras foram mantidas sob refrigeração e enviadas ao laboratório para imediato processamento (em até 24 horas). As amostras PCR-positivas (presença gene Stx) foram definidas como STEC e a prevalência destas foi de 69% nos animais adultos, 66% nos novilhos e 46% para bezerros. Das STEC isoladas, 92 foram selecionadas para sorotipagem, análise de fatores de virulência e teste de sensibilidade antimicrobiana. Setenta e quatro (80%) delas foram classificadas em 25 sorogrupos O (18 cepas não puderam ser identificadas). Trinta e sete isolamentos pertenciam aos sorogrupos O8, O26, O84, O113 e O116. Dois isolamentos eram do sorogrupo O111 e somente um era do sorogrupo O157. Os autores citam que a maior parte das STEC de origem bovina pertencem a cerca de vinte sorogrupos: O4, O8, O22, O25, O32, O45, O82, O84, O103, O111, O113, O116, O121, O136, O146, O153, O157, O171, O172 e OX3 (O174).

No Brasil, CERQUEIRA e col. (1999) através de cultura em ágar MacConkey sorbitol acrescido de cefixima e telurito e testes sorológicos de aglutinação com anti-soro O157 e H7, isolaram 3 cepas de *E. coli* sorotipo O157:H7 de amostras de suabe retal de bovinos sadios, no Estado do Rio de Janeiro. Relatam que este é o primeiro isolamento de *E. coli* O157:H7 em bovinos descrito no Brasil. As cepas foram submetidas ao ensaio da PCR para a presença de genes codificadores de verotoxinas (Stx1 e Stx2), sendo 71% das amostras classificadas como STEC. Descrevem ainda que, duas

das cepas O157:H7, quando realizado o ensaio de citotoxidade em células Vero, não expressaram a toxina.

JOAQUIM e col. (2001) investigaram, através da técnica de multiplex PCR, a presença de genes para Stx1, Stx2 e *eae* em 1.221 amostras fecais de bovinos sadios, procedentes de 47 criações localizadas em cinco regiões geográficas distintas, no Estado do Rio de Janeiro. Verificou-se uma alta freqüência (64%) de amostras Stx-positivas; sendo a ocorrência maior em bezerros (69%) em relação aos animais adultos (59%). Cento e cinquenta amostras Stx-positivas foram novamente submetidas ao multiplex PCR para detecção dos sorogrupos O111, O113 e O157 que foram observados, respectivamente, em 2, 24 e 10 animais, sendo dois considerados como sorotipo O157:H7 (*eae* +, Stx2+).

RIBEIRO e col. (2001) utilizaram a técnica da PCR para detecção dos genes para as toxinas VT1 e VT2 e *eae* em amostras VTEC obtidas de fezes de bovinos sadios da região rural de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Dos 123 isolamentos VTEC (verificados através de ensaio em células Vero), 71% possuiam gene VT2, 28% para VT1 e VT2 e 1% para VT1. Apenas 3% apresentaram gene *eae*.

PRADO e col. (2001) também examinaram pela técnica de multiplex PCR para a sequência de genes Stx1, Stx2 e *eae*, 254 amostras fecais de bovinos sadios nas regiões sul e leste do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras Stx positivas foram observadas em 13 (51,5%) animais, sendo maior nos bezerros (65,4%) em relação aos adultos (34,6%), assim como foi

maior nos animais de corte (61,8%) frente aos de aptidão leiteira (38,2%). Perfis Stx1/*eae* + e Stx1/Stx2/*eae* + foram encontrados em freqüências semelhantes (8,7%).

MOREIRA e col. (2003) investigaram 1.127 isolados de *E. coli* obtidos através de suabe retal de 243 bovinos leiteiros em 60 pequenas propriedades rurais da região de Pelotas. Pelo ensaio de citotoxicidade em células Vero, 49% dos animais e 95% das propriedades foram considerados positivos para presença de STEC. Os 327 isolados STEC obtidos foram encaminhados à FIOCRUZ para realização da sorotipagem pelo teste de aglutinação em tubo, direcionado para os principais sorotipos isolados de casos de diarréia em humanos. Não foi possível determinar a sorotipagem em 315 isolados (96%), pois os mesmos não reagiram com nenhum soro utilizado. Os 12 isolados restantes foram caracterizados como O157:H-, O91:H-, O125:H-, O119:H-, O112:H- e O29:H-, todos imóveis.

TRISTÃO e col. (2003) pesquisaram a ocorrência de isolados STEC em 994 amostras fecais de bovinos sadios, obtidas em 22 propriedades no Estado do Rio Grande do Sul, na região de fronteira com a Argentina. Pela técnica de multiplex PCR foi analisada a presença de genes codificadores de verotoxinas (Stx1, Stx2) e intimina (*eae*). Foram detectados genes Stx em 68% dos animais. As 279 amostras com o perfil Stx+/*eae*+, foram submetidas a outro multiplex PCR sendo verificada a presença dos genes *rfb*O111, *rfb*O113 e *rfb*O157 em, respectivamente, 7 (2,5%), 60 (21,5%) e 19 (6,8%) delas.

Em Curitiba, 107 amostras de suabes retais de bovinos, foram semeadas em ágar MacConkey sorbitol e as colônias sorbitol-negativas foram testadas com anti-soro O157. Foi também realizado o ensaio de citotoxidade em células Vero com posterior análise de multiplex PCR para os genes codificadores de verotoxinas, intimina e hemolisina. Dez isolados provenientes de um mesmo animal, foram caracterizados como *E. coli* O157:H7. A taxa de isolamento de *E. coli* STEC foi de 60%. Após sorotipagem, os sorotipos mais freqüentes foram: O22:H8, O116:H21, O174:H21 e O82:H8 (FARAH e col., 2003).

IRINO e col. (2003), objetivando estimar a prevalência de *E. coli* O157 e outras *E. coli* não-O157, conduziram pesquisa em 6 propriedades de bovinos leiteiros no Estado de São Paulo. As 153 amostras de suabe retal colhidas, foram semeadas em ágar MacConkey sorbitol e as colônias sorbitol-negativo foram testadas com anti-soro O157. Foi também realizado o ensaio em células Vero e os isolados que evidenciaram citotoxidade foram submetidos à prova de hibridização do DNA com fragmentos específicos para os genes codificadores de verotoxinas, enterohemolisinas e intimina. A prevalência de STEC foi de 25,5%, e 14 diferentes sorotipos foram identificados, sendo O113:H21, O79:H14, O98:H17, O88:H25 e O77:H18 os mais frequentes. Dentre os 202 isolados STEC, apenas 2 pertenciam ao sorotipo O157:H7.

Um estudo com o objetivo de investigar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em fezes bovinas submetidas a diferentes temperaturas, mostrou

que este sorotipo pode sobreviver por longo período, mantendo inclusive sua capacidade de produzir verotoxinas. Foram utilizados inóculos com 10^3 e 10^5 UFC/mL, sendo observada a presença do microrganismo por 42 e 49 dias a 37°C, 49 e 56 dias a 22°C; 63 e 70 dias a 5°C. Portanto, as fezes de bovinos seriam uma importante via de eliminação de *E. coli* O157:H7 para o meio ambiente, propiciando a contaminação de alimentos e a infecção de outros animais (WANG e col., 1996).

WRAY e col. (2000) realizaram pesquisa com inoculação experimental de *E. coli* O157:H7 em 6 bezerros (idade entre 13 e 30 dias) e em 6 vacas adultas, mostrando que a excreção fecal do microrganismo persistiu por mais tempo nos bezerros (média de 15 dias após inoculação, mas ocorrendo até 51 dias) do que nos animais adultos (média de 14 dias). Além disso, uma exposição prévia parece não prevenir reinfecções posteriores. Nenhum animal apresentou sintomatologia clínica. Os bezerros foram sacrificados e no exame anátomo-patológico não foram detectadas lesões intestinais e não houve evidência de aderência na mucosa.

Com o objetivo de investigar a tolerância dos bovinos à infecção por *E. coli* O157:H7, amostras de tecidos foram examinadas para verificar a presença do receptor para Stx, o globotriosilceramídeo (Gb_3). Este receptor específico foi detectado nos tecidos renal e cerebral, mas não no trato gastrointestinal. A ausência dos receptores Gb_3 explica o papel dos bovinos como portadores assintomáticos da *E. coli* O157:H7 (PRUIMBOOM-BRESS e col., 2000).

1.3 Identificação Laboratorial

1.3.1 Características Fenotípicas

O sorotipo O157:H7, diferentemente das demais *E. coli*, não fermenta o sorbitol, não possui atividade da β-glucoronidase (MUG-negativo) e não cresce bem nas temperaturas entre 44 e 45°C. Portanto, meios de cultura baseados nestas características devem ser utilizados para o isolamento. Como limitações, pode ser citado o crescimento em ágar MacConkey sorbitol de outras bactérias entéricas, como *Escherichia hermanii* e *Hafnia* spp (oxidase-negativas). Assim sendo, isolados sorbitol-negativos devem ser sorologicamente confirmados frente aos antígenos O157 e H7 (FENG 1995).

1.3.2 Características Genotípicas

Nas últimas duas décadas, os avanços no campo da Biologia Molecular acrescentaram novas contribuições ao estudo da biodiversidade de microrganismos, possibilitando o desenvolvimento da Epidemiologia Molecular. Os médotos moleculares, baseados na análise do material genético (DNA e RNA), permitem a caracterização genotípica dos microrganismos.

O método denominado reação da polimerase em cadeia (PCR), baseado em uma reação de replicação *in vitro*, permite a amplificação de seqüências específicas de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial, utilizando iniciadores (*primers*), ou seja, uma seqüência de

bases já conhecida. A técnica é extremamente sensível, sendo capaz de detectar a presença e amplificar uma única molécula de DNA. Também permite, por exemplo, a identificação de microrganismos, pela detecção de genes codificadores de fatores de virulência.

O princípio da PCR envolve três etapas básicas, necessárias na reação de síntese de qualquer DNA, que são repetidas por várias vezes, em ciclos: (SILVA-PEREIRA, 2003)

1) desnaturação térmica do DNA molde: um a vários minutos à temperatura de 94 - 96°C, período no qual o DNA é desnaturado, apresentando-se em fita simples;

2) anelamento de oligonucleotídeos sintéticos: um a vários minutos a 50°C - 65°C, quando os iniciadores se hibridizam a cada uma das fitas do DNA molde;

3) polimerização das novas fitas de DNA: um a vários minutos a 72°C, período em que a polimerase se liga aos iniciadores e faz a extensão das cadeias complementares ao DNA molde, utilizando cada um dos quatro dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) como substrato da reação de polimerização.

Desta forma, vários pesquisadores aplicaram técnicas moleculares em diversos substratos (amostras clínicas, alimentares e ambientais), objetivando caracterizar genotipicamente os sorogrupos de STEC, bem como o sorotipo O157:H7.

FRATAMICO e col. (1995) descreveram um método de multiplex PCR desenvolvido para a identificação específica do sorogrupo O157, pela

utilização de iniciadores específicos para os genes que codificam Stx1, Stx2, *eae*A e o plasmídeo de 60-MDa (Quadro 4).

Quadro 4: Iniciadores utilizados no multiplex PCR para detecção de *E. coli* O157.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Alvo
MFS1F MFS1R	ACGATGTGGTTTATTCTGGA CTTCACGTCACCATACATAT	plasmídeo 60-MDa
MK1 MK2	TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAATTATTTCGCTC	SLT1 e SLT2
AE19 AE20	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	*eae*A

Fonte: FRATAMICO e col., 1995.

CEBULA e col. (1995) desenvolveram outro método de multiplex PCR para detectar o sorotipo O157:H7, utilizando 2 pares de iniciadores para os genes que codificam Stx1, Stx2 e um par de iniciadores capaz de reconhecer a mutação do gene *uidA* que codifica a β-glucoronidase. Esta mutação no gene *uidA* resulta na característica fenotípica de ausência de atividade da β-glucoronidase (MUG-negativa), característica fortemente associada com o sorotipo O157:H7 (Quadro 5).

Quadro 5: Iniciadores utilizados no multiplex PCR.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Alvo
LP30 LP31	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	SLT-I
LP43 LP44	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	SLT-II
PT-2 PT-3	GCGAAAACTGTGGAATTGGG TGATGCTCCATAACTTCCTG	*uid*A

Fonte: CEBULA e col., 1995.

GANNON e col. (1997) relataram uma técnica de multiplex PCR baseada em iniciadores específicos para a detecção de genes que codificam verotoxinas (*Stx*), intimina (*eaeA)* e o flagelo H7 (*fliC*), visando aumentar a especificidade para o grupo EHEC.

PATON e PATON (1998) desenvolveram um método para detecção e caracterização de STEC em culturas de fezes ou alimentos, combinando 2 multiplex PCR. O primeiro utiliza 4 pares de iniciadores para detectar a presença de genes que codificam Stx1, Stx2 (incluindo as variantes), eaeA e hlyA (enterohemolisina), gerando produtos (*amplicons*) com, respectivamente, 180, 255, 284 e 534 pares de bases (pb). O segundo, detecta a presença de genes relacionados com a síntese do antígeno O (*rfb*), nos sorogrupos O157 e O111, gerando *amplicons* de 259 e 406 pb (*Quadro 6*).

Os autores relatam que nos testes de multiplex PCR aplicados em amostras de fezes ou alimentos, a interpretação dos resultados pode ser dificultada pela possibilidade dos perfis genotípicos obtidos representarem uma soma de genótipos, ou seja, mais de um sorotipo de STEC, ressaltando a importância de realizar o isolamento microbiológico da cultura.

Quadro 6: Iniciadores utilizados no multiplex PCR.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Alvo
mPCR1		
Stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	*Stx1*
Stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	
Stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	*Stx2*
Stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	*eae*A
eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	*hly*A
hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
mPCR2		
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	$rfbE_{O157:H7}$
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	
O111F	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC	*E. coli* O111 *rfb*
O111R	ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC	

Fonte: PATON e PATON, 1998.

HU e col. (1999) descrevem um multiplex PCR (mPCR) direcionado para a detecção de genes envolvidos na biossíntese dos antígenos O157 e H7 e na codificação dos principais fatores de virulência do grupo STEC (Stx1, Stx2, eaeA) em fezes bovinas previamente inoculadas com *E. coli* O157:H7 (Quadro 7).

Os autores relatam que o método possibilita a simultânea identificação do sorotipo O157:H7 e dos fatores de virulência. Mas ressalvam a necessidade de realização de uma etapa de enriquecimento da cultura de fezes, antes de se proceder a PCR, visto que a aplicação da técnica diretamente nas fezes, resultou em grande perda de sensibilidade e de confiança no resultado, conseqüência da presença de inibidores nas amostras fecais.

Quadro 7: Iniciadores utilizados no mPCR para detecção de *E. coli* O157:H7.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Alvo
SLT-IF	TGTAACTGGAAAGGTGGAGTATAC	SLT-I
SLT-IR	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC	
SLT-IIF	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCCG	SLT-II
SLT-IIR	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	
IntF	GACTGTGGATGCATCAGGCAAAG	Intimina
IntR	TTGGAGTATTAACATTAACCCCAGG	
RfbF	GTGTCCATTTATACGGACATCCATG	O157
RfbR	CCTATAACGTCATGCCAATATTGCC	
FLIC $_{h7}$-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	H7
FLIC $_{h7}$-R	CAACGGTGACTTATCGCCATTCC	

Fonte: HU e col., 1999.

OSEK (2003) descreve uma complexa combinação de 6 diferentes multiplex PCR, utilizando iniciadores descritos por diferentes autores, objetivando identificar STEC com base na caracterização dos principais fatores de virulência (Stx1, Stx2 e variantes, eaeA, hlyA) e nos genes específicos para caracterizar o sorotipo O157:H7 (*rfb e fliC*).

Outros autores procuraram desenvolver iniciadores direcionados para a amplificação de genes específicos para o microrganismo de interesse.

Em 1996, os estudos de BILGE e col. demonstraram que a presença do gene *rfb* é necessária para a expressão do antígeno O157, tanto no sorogrupo O157, quanto no sorotipo O157:H7.

DESMARCHELIER e col. (1998) desenvolveram um método de PCR específico para *E. coli* O157, usando seqüências baseadas no gene *rfb*, que codifica as enzimas necessárias à biossíntese do lipopolissacarídeo O157 (Quadro 8). Os iniciadores foram testados frente a 60 sorotipos de *E. coli* e a 6 espécies de patógenos pertencentes a outros gêneros (*Vibrio cholerae,*

Staphylococcus aureus, Citrobacter freundii, Yersinia enterocolitica O9, *Brucella abortus* e *Salmonella* sorovar Angoda). Todos os sorotipos O157:H7 e O157:NM, apresentaram o *amplicon* de 497 pb, enquanto que os demais sorotipos de *E. coli* e os outros microrganismos testados, não produziram nenhum tipo de fragmento detectável no gel de eletroforese.

Os autores aplicaram este teste para avaliar a detecção de *E. coli* O157 em amostras de leite cru, submetidas previamente à concentrações conhecidas de inóculo de *E. coli* O157, evidenciando a capacidade de detecção em concentrações menores que 1 UFC/mL. Ressaltam que esta técnica, além de sensível e específica, é também um método rápido para a confirmação do sorogrupo O157, apresentando um grande potencial para utilização como prova de triagem para a pesquisa deste sorogrupo em amostras alimentares, fecais e ambientais.

Quadro 8: Iniciadores utilizados na PCR para detecção do sorogrupo O157.

Iniciador	**Seqüência (5' – 3')**	**Alvo**
O157AF	AAG ATT GCG CTG AAG CCT TTG	*rfb*
O157AR	CAT TGC CAT CGT GTG GAC AG	*rfb*

Fonte: DESMARCHELIER e col., 1998.

MAURER e col. (1999) também desenvolveram um método de PCR para detectar *E. coli* O157 através de iniciadores para o gene *rfb*, específico para o sorogrupo O157 (Quadro 9). O trabalho se baseia na hipótese de que uma única seqüência gênica, como a região que codifica o gene *rfb*, pode ser utilizada como uma prova de DNA específica para a triagem de isolados em amostras clínicas, mesmo considerando-se a diversificada natureza

bioquímica e sorológica de outros microrganismos presentes no trato intestinal. Os autores ainda comentam que a principal vantagem deste teste é a especificidade para o sorogrupo O157, e que nos demais métodos moleculares voltados para a detecção de fatores de virulência, podem ocorrer variações na distribuição gênica, muitas vezes não permitindo a separação das *E. coli* patogênicas das não patogênicas para o homem.

Quadro 9: Iniciadores utilizados na PCR para detecção do sorogrupo O157.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Alvo
O157PF8	CGT GAT GAT GTT GAG TTG	*rfb*
O157PR8	AGA TTG GTT GGC ATT ACTG	*rfB*

Fonte: MAURER e col., 1999.

KIMURA e col. (2000) desenvolveram um método denominado RSS-PCR ("restriction-site-specific") para a detecção de *E. coli* O157:H7 que é simples, rápido e não requer laboriosa extração e purificação do DNA, nem equipamentos muito sofisticados. É uma técnica baseada no princípio de RFLP ("restriction fragment lenght polymorfism"), mas sem a necessidade de utilização das endonucleases. Utiliza iniciadores que são homólogos a enzimas de restrição específicas, e que reconhecem seqüências de 10 a 18 pares de bases. Apoia-se no princípio de que cada microrganismo exibe variação genética no número e locais de seqüência de restrição em seu genoma. Na aplicação deste método, ocorre a amplificação de diversos fragmentos de DNA, possibilitando uma diferenciação genotípica com base no padrão de múltiplas bandas obtido, produzindo um perfil único para cada diferente sorotipo (*fingerprint*).

Este método é baseado no gene *chuA*, que codifica o receptor externo de membrana para o transporte de ferro, sendo específico para *E. coli* e, portanto, não são gerados padrões de bandas para outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. O método foi desenvolvido para, após o microrganismo ser caracterizado como *E. coli*, diferenciar os sorotipos através dos perfis obtidos, e evidenciou um padrão genotípico para O157:H7 distinto dos demais sorotipos de *E. coli*. Os autores destacam como principais vantagens do RSS-PCR, a geração de padrões de bandas que são distintos para os diferentes sorotipos de *E. coli* e, ao contrário da análise de RFLP convencional, não requer a utilização de enzimas de restrição nem o uso de vários pares de iniciadores como nas técnicas de multiplex PCR. Concluem ainda que este teste possibilita a redução de resultados falso-positivos, aumentando a especificidade e a confiança na interpretação dos resultados, sendo ainda útil como uma maneira rápida de testar *E. coli* O157:H7, em isolados de amostras clínicas, alimentares e ambientais.

Com base na literatura analisada, o presente estudo buscou caracterizar através de métodos convencionais e moleculares os isolados presuntivos de *E. coli* sorogrupo O157, obtidos de amostras fecais de bovinos, sendo delineados os objetivos a seguir descritos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aplicação de métodos moleculares, visando caracterizar *Escherichia coli* sorogrupo O157, em isolados microbiológicos obtidos de amostras fecais de bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o isolamento, identificação e sorotipagem de *E. coli* O157 a partir de fezes bovinas.
- Confirmar a identificação dos isolados obtidos através da técnica da PCR utilizando iniciadores específicos para o gene *rfb*.
- Caracterizar os isolados através do padrão de banda obtido (*fingerprint*), a partir de RSS-PCR, com base no gene *chuA*.
- Identificar, quando possível, o sorotipo O157:H7.
- Discutir a importância da utilização de métodos moleculares para o estudo de isolados com sorologia positiva para o sorogrupo O157.

3 MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram obtidas amostras fecais de 44 bovinos sadios, colhidas diretamente da porção final do reto de cada animal, em propriedades de exploração leiteira e em abatedouro com serviço de inspeção oficial.

As amostras foram transportadas sob condição de refrigeração (caixas isotérmicas com gelo) e encaminhadas ao laboratório da Faculdade de Saúde Pública para pesquisa do patógeno. Foi identificada a finalidade de produção do animal (pecuária de corte ou leiteira) que deu origem a amostra, bem como sua procedência.

3.2 Análise Microbiológica

Para cada amostra individual, cerca de um grama de fezes foi transferido para tubo contendo 10 mL de meio de enriquecimento, Caldo EC (anexo A.1.1), e incubado a 37°C por 24 horas.

Após esse período, uma alíquota (1 alçada) de cada tubo foi semeada (técnica de "esgotamento") em cinco placas de ágar MacConkey sorbitol (Fluorocult®, Merck – anexo A.1.3). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

De cada placa com crescimento bacteriano, selecionou-se cerca de 5 colônias não fermentadoras de sorbitol (coloração esverdeada do meio) e MUG-negativas (não apresentaram fluorescência à luz ultra-violeta). Cada colônia foi testada pela prova da oxidase (anexo A.2), selecionando-se as caracterizadas como oxidase negativa, que foram então individualmente semeadas em tubo com ágar Lúria (anexo A.1.2), identificadas e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.3 Sorologia

As colônias previamente isoladas em ágar Lúria foram testadas com anti-soro O157 (soro anti *E. coli* O157®, Probac). Uma alíquota do crescimento bacteriano foi diluída em solução salina estéril (0,9%) e 20 μL foram colocados em placa de vidro para sorologia, acrescentados de 20 μL de anti-soro, homogeneizados durante 2 minutos e verificados quanto a formação de grumos. A presença de aglutinação foi interpretada como reação positiva.

3.4 Técnicas moleculares

Através do método da PCR, as colônias positivas na sorologia frente ao anti-soro O157, foram analisadas quanto a presença do gene *rfb,* característico para o sorogrupo O157.

As amostras também foram submetidas à técnica de RSS-PCR (PCR - sítio específico de restrição), desenvolvido para caracterizar o perfil molecular dos isolados.

Cepa controle positivo também foi utilizada, tanto para a sorologia como para o método molecular. A cepa padrão *E. coli* O157H:7 ATCC 43895, gentilmente fornecida pela FIOCRUZ, foi utilizada como controle positivo.

3.4.1 Extração do DNA Genômico

Para a extração de DNA foi utilizada a metodologia de CHAPMAN e col. (2001), com algumas modificações. As cepas, anteriormente semeadas em 5 mL de caldo Lúria (anexo A.1.4) e incubadas por 18 horas a 35°C, foram submetidas a:

- centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 25°C. Desprezou-se o sobrenadante;
- cada *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de água pura estéril (Mili Q), homogeneizado e transferido para microtubo de 1,5 mL (tipo Eppendorf®);
- centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos a 24°C. Desprezou-se o sobrenadante;
- ressuspensão do *pellet* em 200 μL de água MiliQ estéril;
- aplicação de choque térmico, nas seguintes condições de temperatura: 95°C durante 10 minutos, seguido de –20°C por 30 minutos, complementado por 1 minuto a 65°C;

- centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 24°C;
- o sobrenadante foi transferido, com auxílio de um micropipetador, para outro microtubo e armazenado a –20°C, caso não fosse utilizado logo após este processo de extração.

3.4.2 Confirmação do sorogrupo O157 – Ensaio da PCR

Foi utilizado o método descrito por MAURER e col.(1999), modificado. Este método foi empregado pelos autores para detectar *E. coli* O157 através de iniciadores para o gene *rfb*, específico para o sorogrupo O157.

Foram utilizados iniciadores específicos para o sorogrupo O157, abaixo identificados:

- O157PF8 - CGT GAT GAT GTT GAG TTG
- O157PR8 - AGA TTG GTT GGC ATT ACTG

O ensaio da PCR foi realizado com volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de $MgCl_2$ (25mM), 2,5 µL de tampão de amplificação 10X (tris-HCl 100mM, pH 8,3; KCl 500 mM, $MgCl_2$ 15 mM, gelatina 0,01% peso/volume), 0,2 µL de solução de dNTPs (2,5 mM) das bases dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 1 µL de cada iniciador reverso e direto (20 µM); 1,25 U de *Taq* DNA polimerase; 5 µL de DNA bacteriano e água *Mili Q* para ajuste do volume final.

A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradiente® sob as seguintes condições de ciclo:

- um ciclo inicial a 95°C durante 5 minutos;
- 35 ciclos com: desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento com iniciador a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto;
- uma extenção final a 72°C durante 7 minutos, com temperatura de manutenção final a 4°C.

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Cada amostra resultante da PCR foi separada por eletroforese horizontal com 1,5% de agarose em gel corado com brometo de etídeo. Foram transferidos 8 µL de cada amostra para tubo tipo Eppendorf, ao qual foi adicionado azul de bromofenol sendo então o conteúdo transferido para o respectivo poço no gel de agarose. Também foi adicionado ao gel, em posição lateral, o marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, 1 µg/µL, Invitrogen, USA), bem como uma amostra controle positivo (*E. coli* O157:H7 ATCC 43895) e uma controle negativo (ausência de DNA bacteriano). Foram identificadas as posições no gel correspondentes às amostras, ao marcador e aos controles.

Realizou-se a eletroforese do gel durante 1 hora em tampão TAE 1X (anexo A.3.1), com intensidade de corrente de 6 V/cm. Após este período, foi feita a visualização do gel em luz ultravioleta e, para a captação da imagem, foi utilizado o software LabWorks, versão 4.0, UVP.

3.4.4 Ensaio de RSS-PCR / *Fingerprinting*

Foi utilizado o método desenvolvido por KIMURA e col. (2000), para identificar o perfil molecular dos isolados, baseando-se no gene *chuA,* responsável pelo transporte de ferro e específico para *E. coli.* Os iniciadores empregados estão abaixo identificados:

- EC – 1 5' GGC AGC CAG CAT TTT TTA
- EC – 2 5' CAG CCA ACA GAG AAG CCA

O ensaio de RSS-PCR foi realizado com volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de $MgCl_2$ (25mM), 2,5 µL de tampão de amplificação 10X, 0,2 µL de solução de dNTPs (2,5 mM), 1 µL de cada iniciador reverso e direto (20 µM); 1,25 U de *Taq* DNA polimerase; 5 µL de DNA bacteriano e água *Mili Q* para ajuste do volume final.

A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradiente® sob as seguintes condições de ciclo:

- um ciclo inicial a 95°C durante 5 minutos;
- 35 ciclos com: desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento com *primer* a 42°C por 2 minutos e complementada por extensão a 72°C por 5 minutos;
- um ciclo final a 72°C durante 10 minutos, com temperatura de manutenção final a 4°C.

3.4.5 Eletroforese em gel de agarose

Cada amostra resultante da PCR foi separada por eletroforese horizontal com 1,8% de agarose em gel corado com brometo de etídeo. Foram transferidos 8 µL de cada amostra para tubo tipo Eppendorf®, ao qual foi adicionado azul de bromofenol sendo então o produto colocado para preencher o poço do gel de agarose. Também foi adicionado ao gel, em posição lateral, o marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, 1µg/µL, Invitrogen, USA), bem como uma amostra controle positivo (*E. coli O157:H7* ATCC 43895) e uma controle negativo (ausência de DNA bacteriano). Foram identificadas as posições no gel correspondentes às amostras, ao marcador e aos controles.

Realizou-se a corrida do gel durante 75 minutos em intensidade de corrente de 6 V/cm, em tampão TAE 1X (anexo A.3.1). Após este período, foi feita a visualização do gel em luz ultravioleta e, para a captação da imagem, foi utilizado o software LabWorks, versão 4.0, UVP.

3.4.6 Análise dos perfis genômicos – *fingerprint*

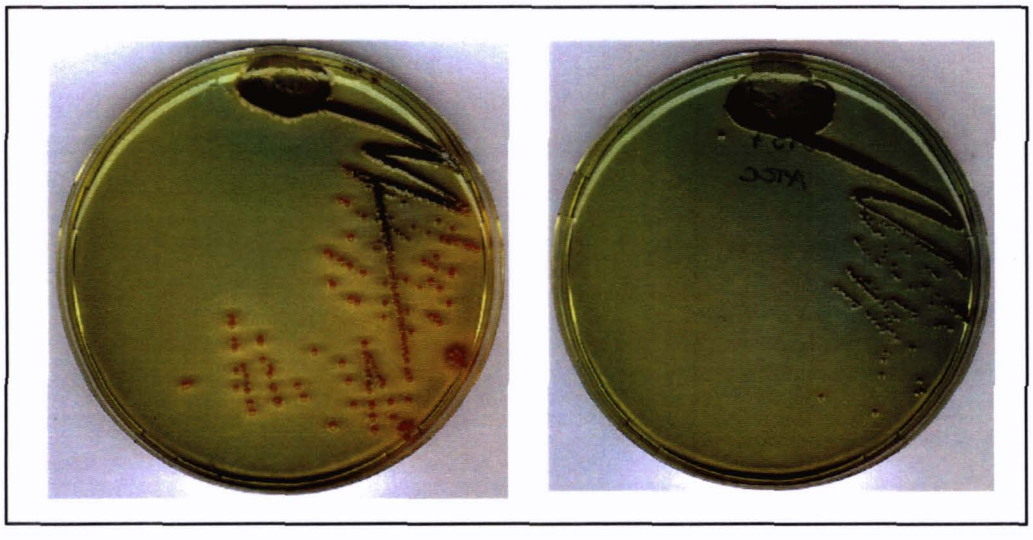
Os perfis obtidos pela técnica da RSS-PCR foram analisados e agrupados com a utilização de *software* específico desenvolvido para a comparação do padrão de bandas, usando coeficiente de Pearson (GelWorks 1D Advanced- UVP, versão 4.01). Os perfis encontrados foram graficamente demonstrados por um dendrograma.

4 RESULTADOS

A partir das 44 amostras de fezes bovinas semeadas em ágar Fluorocult®, foram selecionadas 422 colônias com base nas seguintes características fenotípicas: sorbitol-negativas, MUG-negativas e oxidase-negativas (Figura 1). Estas colônias foram então isoladas em meio de conservação (ágar Lúria) para análises posteriores. Quando submetidas à prova sorológica com anti-soro O157 (Probac®), 120 delas apresentaram reação de aglutinação, sendo então consideradas como isolados presuntivos de *E. coli* sorogrupo O157 (Figura 2).

Os isolados presuntivos foram submetidos ao método molecular da PCR, com iniciadores específicos, objetivando a confirmação do sorogrupo *O157, conforme descrito por MAURER e col. (1999).*

A Figura 3 demonstra que os isolados, quando submetidos à técnica da PCR, não mostraram presença de genes *rfb*, o que, por outro lado, pode ser evidenciado na cepa padrão ATCC pela presença de uma banda com peso molecular de 420 pb.



colônias amarelas = sorbitol-positivo; colônias verdes = sorbitol-negativo

Figura 1. Características de colônias de *E. coli* semeadas em meio Fluorocult®, após incubação a 37°C por 24 horas.

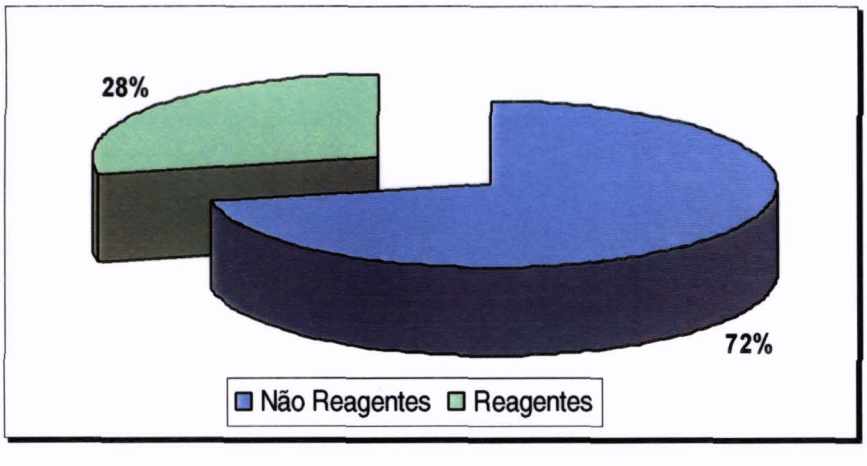
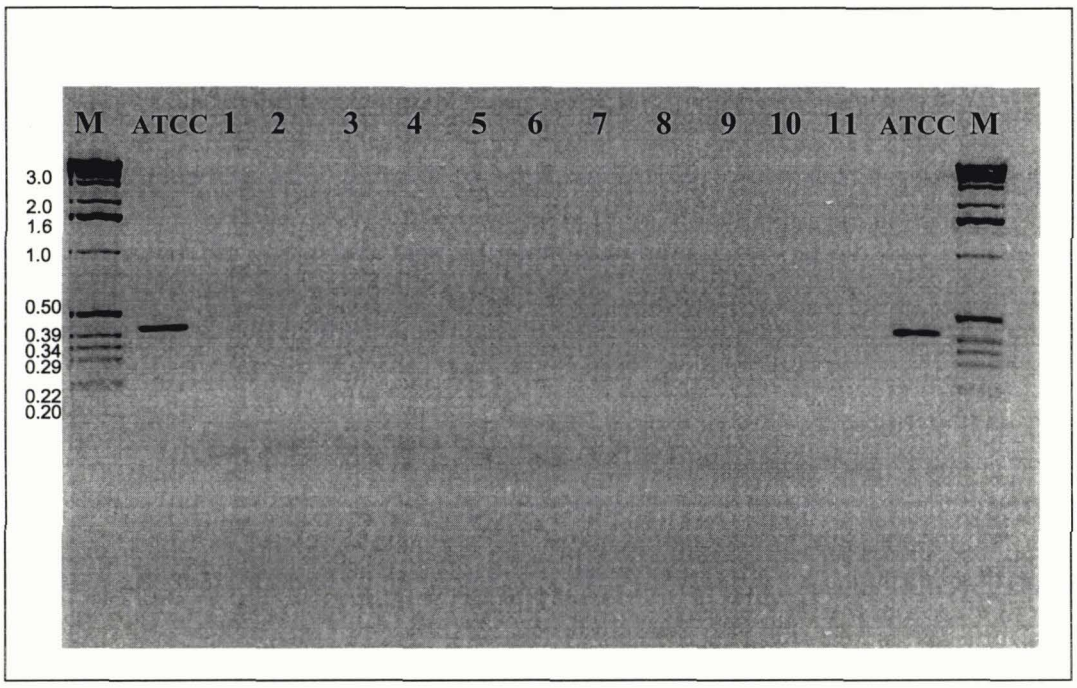


Figura 2. Percentual de isolados positivos na sorologia com anti-soro *E. coli* O157.



M – 1 Kb DNA Ladder; ATCC – *E. coli* O157:H7 ATCC 43895

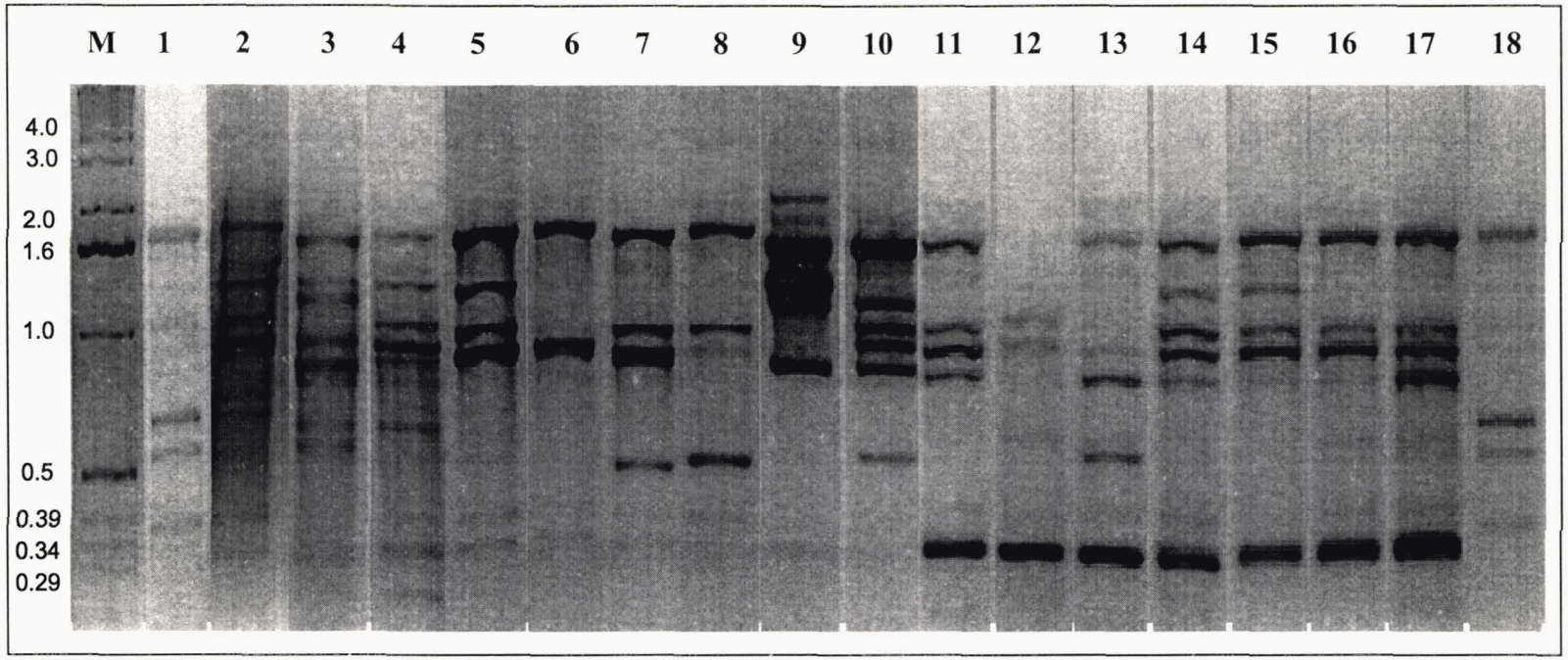
Figura 3: Imagem do gel de agarose dos isolados presuntivos de *E. coli* O157, submetidos ao ensaio da PCR conforme método descrito por MAURER e col. (1999) (modificado).

Foram realizados 13 géis de corrida de eletroforese, correspondentes a análise pela PCR dos 120 isolados, sendo todos semelhantes ao exposto na Figura 3, confirmando que os isolados, apesar de terem apresentado reação sorológica positiva, não pertencem ao sorogrupo O157.

Apesar da confirmação de resultado negativo para a identificação do sorogrupo O157, deu-se continuidade à pesquisa, visando a caracterização do perfil molecular dos isolados, conforme descrito por KIMURA e col. (2000).

A Figura 4 demonstra os 16 perfis moleculares obtidos quando os isolados foram submetidos à técnica de RSS-PCR. A Figura 5 mostra o dendrograma obtido pela análise dos perfis moleculares, agrupando-os de acordo com o coeficiente de similaridade.

Os resultados portanto não confirmaram a presença do sorogrupo O157 nas amostras pesquisadas mas evidenciaram que as técnicas aqui empregadas, com o objetivo de identificar o sorogrupo O157, foram capazes de evidenciar e caracterizar a cepa padrão *E. coli* O157H:7.



M- 1 Ikb DNA Ladder; 1 e 18 – *E. coli* O157:H7 ATCC 43895; 2 a 17 cepas em testes.

Figura 4 – Imagem do gel de agarose 1,8% contendo os diferentes fragmentos obtidos a partir do RSS -PCR segundo KIMURA (2000) de cepas de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de bovinos, 2002.

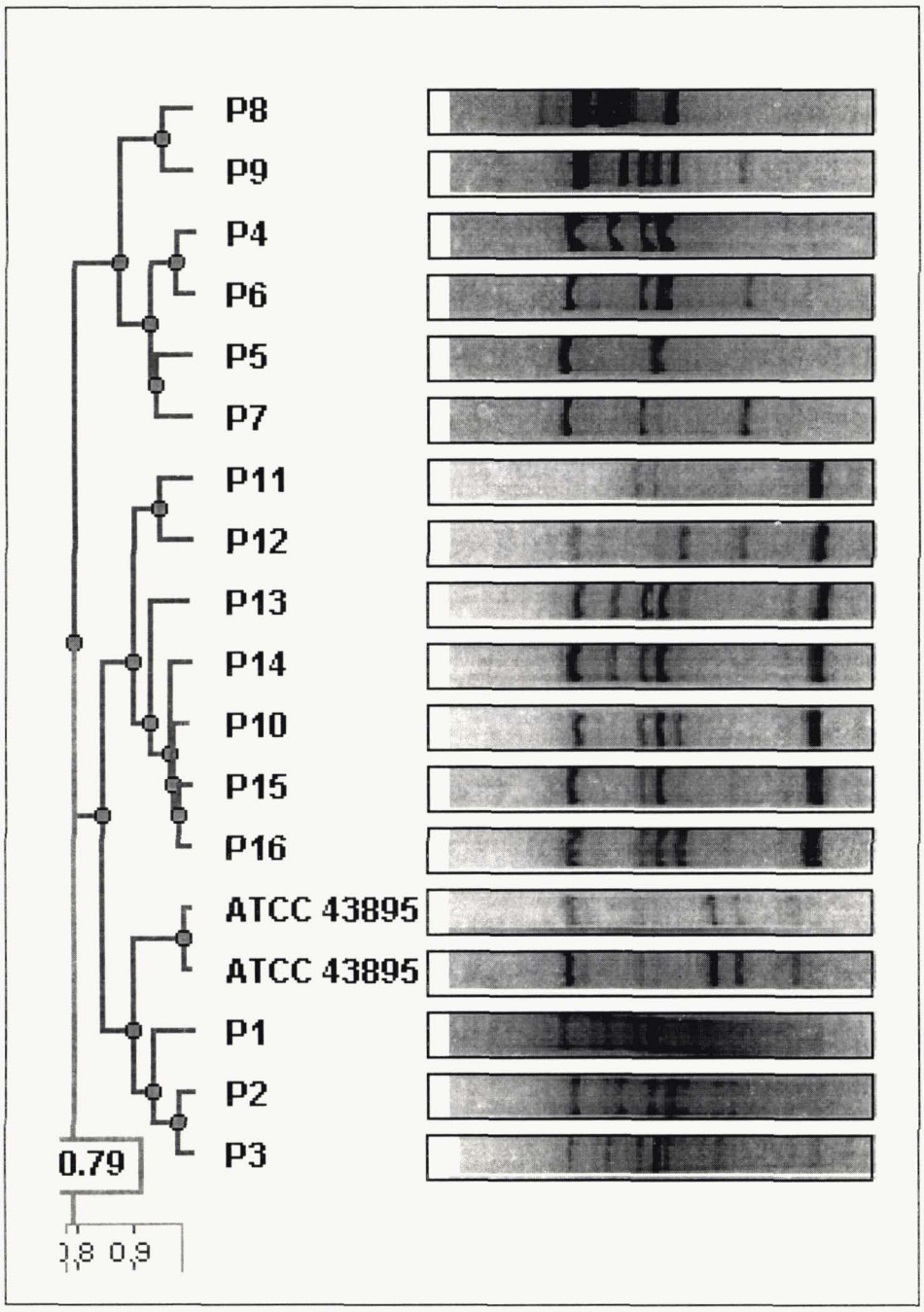


Figura 5 – Representação gráfica da matriz de similaridade de Pearson dos fragmentos obtidos por de RSS-PCR segundo KIMURA (2000) de cepas de *E. coli* isoladas de fezes de bovinos, 2002.

5 DISCUSSÃO

A identificação de *E. coli* sorogrupo O157 apoia-se em uma combinação de provas bioquímicas, sorológicas e moleculares, representando ainda um desafio para os laboratórios de Saúde Pública, sobretudo na diferenciação do sorotipo *E. coli* O157:H7 dos demais isolados comensais de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal.

Nos dados de literatura, uma grande parte dos autores empregam meios de cultura baseados nas características bioquímicas do sorotipo O157:H7, principalmente a ausência de fermentação do sorbitol.

CERQUEIRA e col. (1999) por cultivo em ágar MacConkey sorbitol acrescido de cefixima e telurito, isolaram 3 cepas de *E. coli* sorotipo O157:H7, no Estado do Rio de Janeiro, sendo este o primeiro isolamento de *E.coli* O157:H7 em bovinos relatado no Brasil.

IRINO e col. (2002) relataram o primeiro isolamento no Brasil de *E. coli* O157:H7 em amostras clínicas que foram semeadas em ágar MacConkey, o qual é indicado para o isolamento do gênero *E. coli*, porém não permite evidenciar as colônias não fermentadoras do sorbitol, característica presente no sorotipo O157:H7.

Em outra pesquisa buscando o isolamento de *E. coli* O157 em fezes bovinas, IRINO e col. (2003) utilizaram ágar MacConkey sorbitol como meio de cultura, sendo as colônias sorbitol-negativas testadas com anti-soro O157.

PIGATTO col. (2003) analisaram 50 amostras de suabe retal de bezerros, colhidas em propriedades leiteiras no Estado do Paraná, e semeadas em ágar MacConkey sorbitol. As colônias sorbitol-negativas foram testadas com anti-soro O157, não sendo observada reação positiva.

FARAH e col. (2003) obtiveram em um abatedouro de Curitiba, 107 amostras de suabe retal de bovinos que foram semeadas em ágar MacConkey sorbitol. Todas as colônias sorbitol-negativas foram testadas com anti-soro O157. Houve o isolamento de 10 colônias O157:H7, obtidas de um mesmo animal.

A utilização de meio seletivo baseado na presença ou ausência de fermentação do sorbitol e de atividade da β-glucoronidase com posterior sorologia para o sorogrupo O157, também foi a metodologia escolhida no presente estudo, e que, como nos outros trabalhos relatados, possibilitou a triagem de colônias características.

CERQUEIRA e col. (1999) discorrem ainda que, apesar de outros autores citarem a utlilização da técnica de separação imunomagnética no sentido de favorecer o isolamento do sorogrupo O157, este procedimento não foi utilizado em sua pesquisa, e mesmo assim foi obtido o isolamento de 3 cepas de *E. coli* O157:H7.

Já GONZALEZ e col. (2003), utilizando o método de separação imunomagnética, obtiveram 33 isolados de *E. coli* sorogupo O157 dos quais 13 foram caracterizados como O157:H7. Os isolados foram obtidos de amostras fecais de bovinos sadios no Estado do Rio de Janeiro.

ONUMA e col. (2003) também utilizaram a técnica de separação imunomagnética para detectar *E. coli* sorogupo O157 em 100 amostras de fezes de bezerros e em 30 amostras da carne moída, colhidas no Estado de São Paulo, não obtendo resultado positivo em nenhuma das amostras analisadas.

Embora ocorram relatos de técnicas mais complexas, como a separação imunomagnética para incrementar o isolamento das STEC, esta técnica não foi adotada no presente estudo, devido ao seu custo mais elevado, limitação para utilização de kits importados e também com base em estudos, conforme os descritos anteriormente, que obtiveram isolados apenas com a utilização dos métodos convencionais.

Vários autores observaram a ocorrência de resultados falso-positivos nas provas sorológicas. Foi relatada a reação cruzada do anti-soro O157 com outros gêneros de bactérias (*Citrobacter*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Hafnia*, *Escherichia hermanii*, *Morganella* e *Salmonella*). A reatividade com *Escherichia hermanii* é um particular problema porque seu padrão bioquímico é similar ao de *E. coli* O157:H7 (sorbitol-negativo e MUG-negativo). (LIOR e BORCZYK 1987; KARMALI 1989; GRIFFIN e TAUXE 1991; FENG 1995; MAURER e col. 1999)

À semelhança dos resultados obtidos nesta pesquisa de *E. coli* sorogrupo O157 em fezes bovinas, outros autores revelaram a ocorrência de reações sorológicas falso-positivas.

ALEKSIC e col. (1992) observam que, nas provas sorológicas, quando da utilização de anti-soro específico para o sorogrupo O157, devem ser consideradas as possíveis reações antigênicas com outros sorotipos de *E. coli* e até com outros gêneros de bactérias. Os autores demonstram a reação sorológica cruzada com outras bactérias Gram-negativas (*Salmonella urbana*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*) e ainda com outros 12 sorotipos de *E. coli*, O7:H-, O8:H9, O36:H9, O59:H19, O71:H12, O79:H40, O97:H-, O103:H8, O116:H6, O147:H-, O165:H- e O168:H-.

PERRY e BUNDLE (1990) observam uma intensa reação cruzada na sorologia do sorogrupo O157 com as espécies: *Escherichia hermanii*, *Brucella abortus* e *Brucella melitensis*. Mostram que as reações falso-positivas ocorrem devido ao 4-amino-4,6-dideoxi-D-manopiranose, um constituinte da cadeia do antígeno O.

MAURER e col. (1999) também relataram que a base bioquímica e sorológica para a reação cruzada com outras bactérias é a presença comum de um açúcar, constituinte da cadeia O do lipopolissacarídeo, o 4-amino-4,6-dideoxi-D-manopiranose.

SILVA e col. (2003) pesquisaram a presença de *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres industrializados (produzidos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil), com provas sorológicas (convencional e kits comerciais). Observaram uma proporção de reações falso-positivas variando de 6 a 13%. Provas subseqüentes não confirmaram a presença do patógeno nas amostras pesquisadas.

Alguns desses achados são semelhantes ao observado no presente estudo, onde foi evidenciada a presença de reação sorológica cruzada e a ausência de *E. coli* sorogrupo O157 em amostras de fezes bovinas colhidas no Estado de São Paulo.

No presente estudo, visto que todos os isolados foram relatados como *E. coli*, não foi possível avaliar a reação cruzada com outros gêneros de bactérias, sugerindo que as reações falso-positivas encontradas tenham ocorrido devido à presença de outros sorotipos de *E. coli*, o que concorda com resultados encontrados na literatura.

Frente a limitação das provas bioquímicas e sorológicas para a confirmação dos isolados presuntivos de *E. coli* sorogrupo O157, buscou-se no presente estudo, a aplicação de métodos moleculares no sentido de complementar a investigação, possibilitando uma maior sensibilidade, especificidade e confiança nos resultados.

Vários pesquisadores com o objetivo de detectar e caracterizar isolados STEC e, particularmente *E. coli* O157:H7, utilizaram técnicas moleculares baseadas na presença ou ausência de fatores de virulência, como seqüências gênicas codificadoras de verotoxinas, intimina, e genes específicos para outras características estruturais (*rfb*, *fliC, uidA* e *chuA*).

CERQUEIRA e col. (1999) analisaram pela PCR a presença de genes que codificam Stx, com posterior verificação da expressão da verotoxina através do ensaio de citotoxidade em células Vero. Foram classificadas como STEC 71% das amostras de fezes de bovinos analisadas.

As 2 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas por IRINO e col. (2002) de amostras clínicas, quando submetidas à técnica da PCR para fatores de virulência foram caracterizadas como Stx2/*eae* +, além de apresentarem efeito citotóxico em células Vero.

IRINO e col. (2003) na pesquisa de *E. coli* O157 em fezes bovinas, submetidas ao ensaio de citotoxidade em células Vero e à provas moleculares de hibridização de DNA para detecção de fatores de virulência (Stx, eae hlyA), caracterizam 25% dos isolados como STEC, considerando como sorotipo O157:H7, apenas 2 destes isolados.

FARAH e col. (2003) realizaram prova de citoxidade em células Vero com posterior ensaio da PCR para pesquisa de fatores de virulência (verotoxina, intimina e enterohemolisina), encontrando uma proporção de 56% de isolados STEC não-O157.

Existem vários métodos de PCR desenvolvidos para detectar cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, no entanto uma limitação destes métodos é não serem específicos o suficiente para diferenciar os diversos sorotipos dentro do grupo STEC.

Enquanto esses métodos permitiram uma melhora na detecção de patógenos, algumas técnicas são caras, laboriosas, demandando tempo para execução, e como já mencionado, não são específicas o suficiente para uma identificação acurada, por exemplo, muitos sorotipos de *E. coli* não-O157:H7 são produtores de verotoxinas e no entanto, não são considerados como causa de doença no ser humano.

Apesar do presente estudo não investigar a presença de fatores de virulência, deve-se ressaltar que a comparação dos dados de prevalência de STEC em rebanhos apresenta limitações, sobretudo devido à variedade de metodologias utilizadas, bem como às diferentes técnicas de isolamento empregadas pelos diversos autores e grupos de pesquisa.

Como observado na revisão da literatura, a utilização de genes mais específicos para diagnóstico da *E. coli* O157:H7, como o *rfb*, específico para o antígeno O157, vem sendo empregada por vários pesquisadores, paralelamente ao desenvolvimento do presente projeto, demonstrando uma escolha adequada do gene pesquisado.

ONUMA e col. (2003) analisaram, através da PCR com base no gene *rfb* O157, 100 amostras fecais de bezerros e 30 amostras de carne moída obtidas no Estado de São Paulo, não evidenciando a presença do sorogrupo O157 nas amostras pesquisadas.

GONZALEZ e col. (2003), no Estado do Rio de Janeiro, na análise de 518 isolados de *E. coli* classificados como STEC, verificaram que 33 (6%) apresentavam o gene *rfb*O157, sendo que destes, 13 foram considerados *E. coli* O157H:7.

JOAQUIM e col. (2003) na pesquisa de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em fezes bovinas colhidas em propriedades no município de Miracema, região Noroeste Fluminense, também analisaram a presença dos genes *rfb*O157, *rfb*O111 e *rfb*O113. Observaram que 24% das amostras STEC foram positivas para um dos 3 antígenos pesquisados, citando o

sorogrupo O113 como predominantemente encontrado (83%), sem mencionar qual foi a freqüência do sorogrupo O157 encontrada.

TRISTÃO e col (2003), na pesquisa de *E. coli* em fezes bovinas, no Estado do Rio Grande do Sul, relataram que na análise da PCR foram detectados os genes *rfb*O157 *rfb*O111 e *rfb*O113 em, respectivamente, 19, 7 e 60 do total de 279 isolados STEC (perfil Stx+/*eae*+).

No presente estudo, embora não tenha sido observada a presença do gene *rfb* nos isolados submetidos à técnica da PCR, o método molecular foi de fundamental importância para confirmar que os isolados presuntivos não pertenciam ao sorogrupo O157, evidenciando o resultado falso-positivo obtido na prova sorológica.

Portanto os resultados demonstram que a técnica da PCR com os iniciadores para o gene *rfb*, específico para o sorogrupo O157, por ser de fácil e rápida execução e apresentar alta especificidade, pode ser empregada como ferramenta na triagem de isolados obtidos por métodos convencionais de isolamento e identificação.

Embora os dados obtidos não tenham confirmado a presença do sorogrupo O157 nas amostras pesquisadas, estas ainda foram submetidas à técnica da RSS-PCR, com base no gene *chuA*, visando a caracterização do padrão de bandas moleculares dos isolados, possibilitando sua comparação com a cepa padrão, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895.

A utilização de técnicas que permitem evidenciar o padrão de bandas (*fingerprint*) do organismo de interesse, representa um grande avanço na Epidemiologia Molecular, possibilitando, estabelecer correlações clínicas, geográficas e ambientais, sendo portanto de fundamental contribuição à Saúde Pública.

Nenhuma correlação do perfil de bandas dos isolados frente a cepa padrão ATCC foi observada neste estudo, demonstrando que esta técnica é bastante sensível para caracterizar o padrão de bandas de isolados de *E. coli*, além de possibilitar especificidade na amplificação do padrão molecular do sorotipo O157:H7.

Neste trabalho optou-se pelas técnicas descritas com base na sensibilidade, praticidade, rapidez e especificidade para o sorogrupo O157; tendo em vista que elas apresentam um grande potencial de utilização como prova de triagem para a presença do sorogrupo O157 e do sorotipo O157:H7, em isolados presuntivos obtidos de amostras fecais. Com base no relatado por diversos autores, elas também são viáveis para serem aplicadas na triagem de amostras clínicas, ambientais e de alimentos. A partir da caracterização do microrganismo de interesse, outras técnicas *complementares poderão ser realizadas, como, por exemplo, a* caracterização de fatores de virulência.

6 CONCLUSÕES

- A presença de diferentes sorogrupos de *E. coli* em fezes de bovino foi evidenciada;
- Foi possível observar a presença de reação falso-positiva na sorologia para o sorogrupo O157;
- Pela técnica da PCR foi possível confirmar que os isolados presuntivos de *E. coli* O157, não pertenciam a este sorogrupo;
- A técnica de RSS-PCR possibilitou a visualização do padrão de bandas de diferentes sorogrupos de *E. coli*, quando comparadas com o padrão de bandas da cepa ATCC de *E. coli* O157:H7;
- Foi evidenciada a importância da utilização de métodos moleculares em complementação aos métodos convencionais (microbiológico e sorológico), na confirmação de isolados presuntivos de *E. coli* O157:H7.

7 REFERÊNCIAS

Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. **Appl Environ Microbiol** 1993; 59:1999-2006.

Adams MR, Moss MO. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza, Espanha:Editorial Acribia, 1995. Agentes bacterianos de enfermedad transmitida por alimentos; p. 226-233.

Aleksic S, Karch H, Bockemuhl J. A biotyping scheme for Shiga-like (Vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other gram-negative bacteria. **Zbl Bakt** 1992; 276:221-230.

Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barret TJ, Wells JG et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **JAMA** 1993; 269:2217-2220.

Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J Clin Microbiol** 1993; 31:2483-2488.

Bilge SS, Vary Jr JC, Dowell SF, Tarr PI. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. **Infect Immun** 1996; 64:4795-4801.

Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Ramos J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Am J Vet Res** 1993; 54:1446-1451.

Booth L, Rowe B. Possible occupational acquisition of *Escherichia coli* O157 infection. **Lancet** 1993; 342:1298-1299.

Brewster DH, Browne MI, Robertson D, Houghton GL, Bimson J, Sharp JCM. An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. **Epidemiol Infect** 1994; 112:441-447.

Brown JE, Echeverria P, Taylor DN, Seriwatana J, Vanapruks V, Lexomboon U et al. Determination by DNA hybridization of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. **J Clin Microbiol** 1989; 27:291-294.

Burnens AP, Zbinden R, Kaempf L, Heinzer I, Nicolet J. A case of laboratory acquired infection with *Escherichia coli* O157:H7. **Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis** 1993; 279:512-517.

Burnens AP, Frey A, Lior H, Nicolet J. Prevalence and clinical significance of vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. **J Vet Med** 1995; 42: 311-318.

Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. **J Clin Microbiol** 1995; 33:248-250.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers – Western United States, 1992-1993. **MMWR** [serial on line] 1993; 42(14):258-263. Available from <URL: http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml> [2001 May 29]

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami – Washington and California, 1994. **MMWR** [serial on line] 1995; 44(09):157-160. Available from <URL: http:www.cdc.gov.epo/mmwr/preview/mmwrhtml> [2001 May 29]

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider – Connecticut and New York, October 1996. **MMWR** [serial on line] 1997a; 46(01):4-8. Available from <URL: http://www.cdc.gov./epo/mmwr/preview/mmwrhtml > [2001 May 29]

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfafa sprouts – Michigan and Virginia, June-July 1997b. **MMWR** [serial on line] 1997b; 46(32):741-744. Available from <URL: http://www.cdc.gov./epo/mmwr/preview/mmwrhtml > [2001 May 29]

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair – New York, 1999. **MMWR** [serial on line] 1999; 48(36):803. Available from URL<: http://www.cdc.gov./epo/mmwr/preview/mmwrhtml > [2001 May 29]

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Escherichia coli* O157:H7. Paper [on line] 2000.Available from <URL: http://www.cdc.gov> [2001 May 30]

Cerqueira AMF, Guth BEC, Joaquim RM, Andrade JRC. High occurrence of Shiga toxin-producing *Eschericia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet Microbiol** 1999; 70:111-121.

Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. **Epidemiol Infect** 1993; 111:439-447.

Chapman PA, Siddons CA, Malo ATC, Harkin MA. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemio Infect** 1997; 119: 245-250.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Int J Food Microbiol** 2001; 68:11-20.

Day NP, Scotland SM, Cheasty T, Rowe B. *Escherichia coli* O157:H7 associated with human infections in the United Kingdom. **Lancet** 1983; 1(8328):825.

Desmarchelier PM, Bilge SS, Fegan N, Mills L, Vary Jr JC, Tarr PI. A PCR specific of *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. **J Clin Microbiol** 1998; 36:1801-1804.

Eduardo MBP, França ACC, Irino K, Vaz TMI, Guth BEC. Investigação epidemilogica de infecções por Escherichia coli O157:H7 – Campinas, São Paulo. **DTA Informe Net** [on line] 2003. Disponívem em <URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_ing.htm> [2003 set 8]

Faith NG, Shere JA, Brosch R, Arnold KW, Ansay SE, Lee MS et al. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Appl Environ Microbiol** 1996; 62:1519-1525.

Farah SMSS, Silva LR, Castilhos L, Kato MAMF, Ramos II, Vaz TMI et al. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle, Paraná, Brazil. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MV 093. [CD ROM]

Feng P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerg Infect Dis** 1995; 1:47-52.

Franco BDGM, Landgraf M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco BDGM, Landgraf M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 33-81.

Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. **J Clin Microbiol** 1995; 33:2188-2191.

Gannon, VPJ, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol** 1997; 35:656-662.

Germani Y, Minssart P, Vohito M, Yassibanda S, Glaziou P, Hocquet D et al. Etiologies of acute, persistent, and dysenteric diarrheas in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. **Am J Trop Med Hyg** 1998; 59:1008-1014.

Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Appl Environ Microbiol** 1992; 58:2251-3.

Goldwater PN, Bettelheim KA. The role of enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes other than O157:H7 as cause of disease. In: Karmali MA, Goglio AG (eds). **Recents advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections.** Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science; 1994.p.57-60.

Gonzalez AGM, Coutinho CAS, Cerqueira AMF, Guth BEC, Souza RM, Liberal MHT et al. Virulence markers of shiga toxin-producin *Escherichia coli* (STEC) from healthy cattle. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MM 067. [CD ROM]

Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiologic of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol Rev** 1991; 13:60-98.

Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiol Infect** 1994; 113:199-207.

Hu Y, Zhang Q, Meitzler JC. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. **J Appl Microbiol** 1999; 87:867-876.

ICMSF - Comissão Internacional para Especificações Microbiológica dos Alimentos. **Microbiología de los alimentos: caracteristicas de los patógenos microbianos**. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia; 1996. *Escherichia coli* patógeno intestinal; p.147-163.

Irino K, Vaz TMI, Kato MAMF, Naves ZVF, Lara RR, Marco MEC et al. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis** 2002; 8(4): 01-03.

Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Souza MAC, Cruz AS, Gomes TAT et al. Serotypes and virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, São Paulo, Brazil. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MV 015. [CD ROM]

Itoh Y, Sugita-Konishi Y, Kasuga F, Iwaki M, Hara-Kudo Y, Saito N et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. **Appl Environ Microbiol** 1998; 64:1532-1535.

Joaquim RM, Prado EHRB, Pombo CR, Gonzales AGM, Coutinho CAS, Guth BEC et al. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and O157:H7 *E. coli* strains in cattle from distint geographic regions of Rio de Janeiro State, Brazil. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 21; 2001; Foz de Iguaçu. Foz de Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2001. Resumo MH-192.

Joaquim RM, Almeida PMP, Souza RM, Liberal MHT, Bruno LMP, Andrade JRC, et al. Avaliação prospectiva da ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) em bovinos no Município de Miracema – RJ. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MV 034. [CD ROM]

Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick AS et al. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* . **J Food Prot** 1996; 59:1112-1122.

Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **Lancet** 1983; 1(8314):76.

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim, C. Sporadic cases of haemolytic urenic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet** 1983a; 1(8325):619-620.

Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Steele BT. *Escherichia coli* cytotoxin , haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. **Lancet** 1983b; 2(8362):1299-1300.

Karmali MA. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli.* **Microbiol Rev** 1989; 1:15-38.

Katsuya EM, Lerner LH, Costa R, Jakabi M, Dias AMG, Tavechio AT et al. *Escherichia coli* O157:H7, um enteropatógeno emergente. **Rev CIP** 1998; 1:8-9.

Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, Willians Jr LP, Hedberg K, Oxman MD et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei.* **N Engl J Med** 1994; 331:579-584.

Kimura R, Mandrell RE, Galland JC, Hyatt D, Riley LW. Restriction-site-specific PCR as a rapid test to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains in environmental samples. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66:2513-2519.

Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67:484-489.

Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Eschechicia coli.* **Infect Immun** 1977; 18:775-779.

Lerner LH, Katsuya EM. Distribuição dos surtos de diarréia notificados à Divisão de Hídrica – CVE-SES-SP, 1996 e 1997. **Revista CIP** [periódico on line]1998;1:10-11. Disponível em<URL:http://www.cip.saude.sp.gov.br/Revistac.htm >[1999 ago 04}

Lior H, Borczyk AA. False positive identifications of *Escherichia coli* O157. **Lancet** 1987; 1(8528):333.

Lopez EL, Diaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharzu F, Murray BE et al. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. **J Infec Dis** 1989; 160:469-475.

Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L, Lee MD. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65:2954-2960.

Medeiros MIC, Chinarelli S, Poletto MR, Abduch R, Kato MAMF, Vaz TMI et al. *Escherichia coli* O157:H7 e O111:HNM produtoras da toxina Shiga (STEC) em pacientes imunodeprimidos. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MM 320A. [CD ROM]

Miller LG, Kaspar CW. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. **J Food Prot** 1994; 57:460-4.

Montenegro MA, Bülte M, Trumpf T, Aleksic S, Reuter G, Bulling E, et al. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. **J Clin Microbiol** 1990; 28:1417-1421.

Moreira CN, Pereira MA, Brod CS, Rodrigues DP, Carvalhal JB, Aleixo JAG. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Vet Microbiol** 2003; 93:179-183.

Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the comsumption of yoghurt. **Epidemiol Infect** 1993; 111:181-7.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev** 1998; 12:142-201.

Notario R, Fain JC, Prado V, Rios M, Borda N, Gambande T. Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágico en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica da las cepas de origen animal. **Rev Med Chil** 2000; 128:1335-1341.

O'Brien AD, LaVeck GD, Grifin DE, Thompson MR. Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. **Infect Immun** 1980; 30:170-179.

O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* I (Shiga) like cytotoxin. **Lancet** 1983; 1(8326):702.

Ojeda A, Prado V, Martinez J, Arellano C, Borczyk A, Johnson H et al. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. **J Clin Microbiol** 1995; 33:2199-2201.

O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. **Microbes Infection** 2001; 3:494-507.

Onuma DL, Aidar L, Leomil L, Morato ECP, Pestana de Castro AF. Pesquisa de amostras de *Escherichia coli* produtoras de Shiga (STEC) isoladas de fezes de bezerros e de carne bovina no Estado de São Paulo. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MV 147. [CD ROM]

Osek J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. **J Appl Microbiol** 2003; 95:1217-1225.

Ørskov F, Ørskov I, Villar JA. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet** 1987;2(8553):276.

Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Manning PA. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1993; 31:3063-3067.

Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, rfb_{O111}, and rfb_{O157}. **J Clin Microbiol** 1998; 36: 598-602.

Perry MB, Bundle DR. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, B*rucella melitensis*, and B*rucella abortus*. **Infect Immunity** 1990; 58(5):1391-1395.

Pigatto CP, Farah SMSS, Rodriguez MC, Silva LR, Loria G, Calomeno MA. *Escherichia coli* O157:H7 em bezerros leiteiros de propriedades da região sudeste do Paraná. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, *23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade* Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MV 167. [CD ROM]

Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F et al. 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** 2000; 38:1023-1031.

Prado EHRB, Tristão LCS, Gomes MJP, Cerqueira AMF, Guth BEC, Andrade JRC. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) gene sequences in healthy cattle from Rio Grande do Sul State, Brazil. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 21.;2001; Foz de Iguaçu. Foz de Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2001. Resumo MH-160.

Pruimboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA et al. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:10325-10329.

Rao GG, Saunders BP, Masterton RG. Laboratory acquired verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) infection. **J Hosp Infect** 1996; 33:228-230.

Ribeiro GA, Gil RL, Moreira CN, Dellagostin AO, Aleixo JAG. Caracterização molecular de *Escherichia coli* verotoxigênica isoladas de bovinos sadios em Pelotas, RS. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 21;2001; Foz de Iguaçu. Foz de Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2001. Resumo MV-068.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl J Med** 1983; 308:681-5.

Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, Tran N, Nguyen D, Whittam TS et al. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seatle, Washington. **Appl Environ Microbiol** 1994; 60:1038-1040.

Salmon RL, Farrell ID, Hutchison JGP, Coleman DJ, Gross RJ, Fry NK. et al. A christening party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7. **Epidem Inf** 1989; 103:249-54.

Schoeni JL, Doyle MP. Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. **Appl Environ Microbiol** 1994; 60:2958-2962.

Secretaria de Estado da Saúde (SES). Centro de Vigilância Epidemiológica "Professor Alexandre Vranjac". **Relatório dos casos de *E. coli* O157:H7 em Campinas.** São Paulo; 2001. (documento técnico)

Silva N, Silveira NFA, Okazaki MM. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Rev Net-DTA** [periodico on line] 2003; 8:129. Disponível em:<URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/revnet/revista_net.htm> [15 mar 2003]

Silva-Pereira, I. Amplificação de DNA por PCR. In: Azevedo MO, Felipe MSS, Brigido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasilia: Editora UnB; 2003. p. 99-110.

Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell Jr H et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Ann Intern Med** 1992; 117:812-819.

Tozzi AE, Niccolini A, Caprioli A, Luzzi I, Montini G, Zacchelllo G et al. A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of Northern Italy over a period of several months. **Epidemiol Infect** 1994;113:209-219.

Tristão LCS, Coutinho CAS, Gomes MJP, Gonzales AGM, Cerqueira AMF, Guth BEC et al. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle from Rio Grande do Sul State, Brazil. **Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23; 2003; Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003. Resumo MV 034. [CD ROM]

United States. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition (US. FDA). *Escherichia coli* O157:H7. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook.** [monograph on line] Available from <URL: http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap15html> [2001 May 29]

Wallace JS, Cheasty T, Jones K. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. **J Appl Microbiol** 1997; 82:399-404.

Wang G, Zhao T, Doyle MP. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Appl Environ Microbiol** 1996; 62:2567-2570.

Weagant SD, Bryant JL, Bark DH. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnase-based sauces at room and refrigerated temperatures. **J Food Prot** 1994; 57:629-631.

Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN et al. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. **J Clin Microbiol** 1991; 29:985-989.

Wray C, McLaren IM, Randall LP, Pearson GR. Natural and experimental infection of normal cattle with *Escherichia coli* O157. **Vet Rec** 2000; 147:65-68.

Zhao T, Doyle MP. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. **J Food Prot** 1994; 57:780-783.

ANEXOS

A.1 Meios de Cultura

A.1.1 Caldo EC

ágar EC (Difco®)	37 g
água destilada	1000 mL

Dissolver;
Autoclavar por 15 minutos a 121°C;
Distribuir assepticamente 10 mL por tubo;
Guardar em geladeira.

A.1.2 Ágar Lúria

Bacto ágar (Difco®)	1,5 %
Bacto triptona	1,0 %
Extrato de levedura	0,4 %
NaCl	0,5%
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH 6,8	

Dissolver em banho-maria (65°C);
Aquecer e agitar até ficar translúcido;
Autoclavar por 15 minutos a 121°C;
Distribuir assepticamente em tubos com tampão de algodão;
Inclinar até a solidificação;
Conservar em geladeira.

A.1.3 Ágar Mac Conkey sorbitol

ágar Fluorocult®	55 g
água destilada	1.000 mL

pH 7,4 ± 0,2 (a 25°C)

Diluir;
Autoclavar por 15 minutos a 121°C;
Distribuir em câmara de fluxo contínuo (≅ 20 mL por placa);
Guardar em geladeira.

A.1.4 Caldo Lúria

Bacto triptona	1,0 %
Extrato de levedura	0,4 %
NaCl	0,5%
Água destilada q.s.p.	1000 mL

pH 6,8

Diluir;
Autoclavar por 15 minutos a 121°C;
Distribuir assepticamente em tubos;
Conservar em geladeira.

A.2 Prova da Oxidase

Preparo: em um tubo tipo Eppendorf®, colocar uma pitada (0,001 g) de reativo para oxidase (dicloridrato de tetrametil *p*-fenilenodiamina) e 1 mL de água destilada. Homogeneizar bem e verter sobre um papel de filtro colocado em uma placa de Petri. Esperar secar bem antes de usar. Testar com uma bactéria oxidase-positiva (controle positivo).

Princípio: as cepas bacterianas que possuem atividade de citocromo oxidase desenvolvem coloração azul escura no local de inoculação (oxidase-positiva).

Precauções: não utilizar alças de aço inoxidável, porque os produtos de oxidação formados na superfície quando da esterilização na chama, podem produzir reações falso-positivas.

A.3 Reagentes para Eletroforese

A.3.1 TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA)

Solução 50X (estoque):

Tris – base	242,0 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA-Na_2 pH= 8,0	100,0 mL
Água destilada q.s.p.	1000,0 mL

Solução de uso 1X:

TAE 50X	20 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL