

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Caracterização molecular de amostras de Escherichia coli carreadoras dos genes stx isoladas de bovinos nos estados de Rondônia e do Rio de Janeiro”

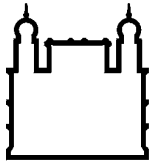
por

Cristiane Mara Silva da Costa

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Hamond Regua Mangia

Rio de Janeiro, março de 2013.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

“Caracterização molecular de amostras de Escherichia coli carreadoras dos genes stx isoladas de bovinos nos estados de Rondônia e do Rio de Janeiro”

apresentada por

Cristiane Mara Silva da Costa

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Alice Gonçalves Martins Gonzalez

Prof.^a Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Prof.^a Dr.^a Adriana Hamond Regua Mangia – Orientadora principal

Dissertação defendida e aprovada em 26 de março de 2013.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas (DCB) e no Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA) da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fundação Oswaldo Cruz, com auxílio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filhote Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu pai Hélio César da Costa *in memoriam*, minha mãe Maria Hercília Silva da Costa, meu irmão Daniel Cesar Silva da Costa e meu noivo Graciano Carlos de Freitas.

AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora da Dissertação de Mestrado Prof. Dr^a. Adriana Hamond Regua Mangia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP/Fiocruz) por toda paciência, ensinamentos e dedicação.

Ao meu irmão, Daniel Cesar Silva da Costa, que foi o responsável pela minha inscrição no programa de Mestrado em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca.

Ao meu noivo, Graciano Carlos de Freitas, por todo carinho e paciência durante esses dois anos de mestrado.

Aos meus pais, Hélio César da Costa (*in memoriam*) e Maria Hercília Silva da Costa, por tudo que puderam me proporcionar e por todos os momentos em que estiveram presentes, sempre dando o melhor de si.

A todos os componentes do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) pelo acolhimento e colaboração, especialmente aos colegas Sandra Regina de Castro Pereira e Wagner Moura Rangel.

A Prof. Dr^a. Alice Gonçalves Martins Gonzales, ao Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo, a Prof. Dr^a. Nathalie Costa da Cunha e a Prof. Dr^a. Flávia Coelho Ribeiro por participarem como componentes da banca de defesa da minha dissertação de mestrado.

Aos médicos veterinários Dr. Bruno Gomes de Castro da Universidade Federal de Mato Grosso e Denis Otaka.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado.

“É preciso que o discípulo da sabedoria tenha o coração grande e corajoso. O fardo é pesado e a viagem longa.”

(Confúcio)

RESUMO

Escherichia coli produtora da toxina Shiga (STEC) é agente de diarreia esporádica e de epidemias, podendo ocasionar quadros clínicos graves em seres humanos. A habilidade de STEC em causar doenças severas em seres humanos está relacionada com a sua capacidade de secretar as toxinas Stx1, Stx2 e/ou variantes toxigênicas. Outro fator de virulência de STEC é a intimina, codificada pelo gene *eae* e associada com aderência íntima, inicialização das vias de transdução de sinais e formação da lesão intestinal íntima. Algumas STEC também produzem enterohemolisina, codificada pelo gene *ehxA*, que tem sido associada com doença severa em seres humanos. Bovinos constituem seu principal reservatório assumindo papel relevante na infecção dos seres humanos. Características de manejo do animal sugerem conferir fatores de risco para a excreção desses patógenos. O objetivo desse estudo foi investigar a prevalência e as características biogenéticas de *Escherichia coli* carreadora dos genes *stx* (STEC), isoladas de amostras fecais de bovinos, com e sem diarreia, de regiões agropecuárias localizadas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia. Para atingir a presente proposta, 301 isolados de *E. coli* provenientes de ambas as regiões, foram submetidos a análises moleculares baseadas em ensaios de amplificação visando o diagnóstico de *E. coli* carreadora do gene *stx*, seu potencial de patogenicidade e diversidade genética. Os resultados dos ensaios de amplificação revelaram que 55,5% (167/301) eram carreadoras do gene *stx*, 36,2% (109/301) *eae*⁺ e 21,3% (64/301) *ehxA*⁺. Das 167 amostras de STEC detectadas, 24 foram isoladas do estado do Rio de Janeiro (14,4%, 24/167) e 143 do estado de Rondônia (85,6%, 143/167). Com base nos marcadores genéticos investigados, 13 perfis foram detectados (*stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂/*eae*, *stx*₁/*stx*₂/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂, *stx*₁/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*ehxA*, *stx*₁, *stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₂/*eae*, *stx*₂/*ehxA*, *stx*₂, *eae*/*ehxA* e *ehxA*). Do total das 167 amostras de STEC, 3,6% (6/167) foram caracterizadas genotipicamente como pertencentes aos sorogrupos O113 e 93,4% (156/167) como O157. Das 156 amostras STEC *rfb*_{O157+}, 64,1% (100/156) foram genotipicamente caracterizadas como O157:H7. A análise filogenética caracterizou a população bacteriana como pertencente aos filogrupos: A (47,3%), B1 (44,9%), D (6,6%) e B2 (1,2%). A análise do genoma total empregando ensaios de amplificação randômica do DNA polimórfico revelou uma elevada diversidade genética entre as amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx* sugerindo constituir uma população bacteriana de origem não-clonal. Nossos resultados nos levam a concluir que a maior prevalência de STEC em Rondônia, possivelmente reflete as condições mais precárias de suas propriedades rurais. O isolamento de STEC de bovinos clinicamente sadios reforça o reconhecido papel desses animais como reservatórios assintomáticos. Nossos resultados contribuíram para o esclarecimento sobre a epidemiologia das STEC em especial, no estado de Rondônia, onde as informações sobre a circulação deste patógeno ainda são limitadas. Esses achados salientam a necessidade de manter uma vigilância epidemiológica ativa, em especial no que diz respeito a estudos sobre reservatórios e atributos de virulência bacteriana.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, STEC, toxina Shiga, bovinos, Rondônia, Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an sporadic agent of diarrhea. The ability of STEC strains to cause severe illness in humans is related to the capacity to secrete Stx1, Stx2, and/or variant toxins. Another virulence factor of STEC strains is intimin, encoded by *eae* gene and associated with intimate adherence to epithelial cells, initiation of host signal transduction pathways and formation of attaching-and-effacing intestinal lesions. Some STEC strains produce also an enterohemorrhagic hemolysin (EHEC-Hly), encoded by *ehxA* gene, which has been associated with severe clinical disease in humans. Cattle are its main reservoir playing a relevant role in human infections. Animal handling characteristics can offer risk factors for the excretion of these pathogens. The aim of this study was to investigate the prevalence and bio-genetics characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from fecal samples of cattle, with and without diarrhea, from livestock breeding regions located in Rio de Janeiro and Rondônia. In order to achieve this proposal, 301 *E. coli* isolates obtained from both regions we submitted to molecular analysis based on amplification assays for STEC diagnosis, its pathogenicity potential and genetic diversity. Results from amplification assays revealed that 55.5% (167/301) were *stx+*, 36,2% (109/301) *eae+* and 21,3% (64/301) *ehxA+*. Of the 167 STEC strains detected, 24 were isolated from the state of Rio de Janeiro (14.4%, 24/167) and 143 were from Rondônia (85,6% , 143/167). Based on the genetic markers investigated 13 profiles were detected (*stx1/stx2/eae/ehxA*, *stx1/stx2/eae*, *stx1/stx2/ehxA*, *stx1/stx2*, *stx1/eae/ehxA*, *stx1/ehxA*, *stx1*, *stx2/eae/ehxA*, *stx2/eae*, *stx2/ehxA*, *stx2*, *eae/ehxA* e *ehxA*). Of the 167 STEC samples, 3.6% (6/167) were genotypically characterized as belonging to serogroup O113 and 93.4% (156/167) as O157. Of the 156 *rfb*_{O157+} STEC strains, 64,1% (100/156) were genotypically characterized as O157:H7. Phylogenetic analysis characterized the bacterial population as belonging to phylogroups: A (47,3%), B1 (44,9%), D (6,6%) e B2 (1,2%). Random amplification of polymorphic DNA typing revealed a high genetic diversity among STEC strains suggesting a non clonal bacterial population. Our results lead us to conclude that the higher prevalence of STEC in Rondônia, possibly reflects the precarious conditions of their farms. The isolation of STEC from clinically healthy cattle reinforces the recognition of these animals as asymptomatic reservoirs. Our results contributed for the STEC epidemiological elucidation, in particular in the state of Rondônia, where information about the circulation of this pathogen is still limited. These findings highlight the need to maintain an active epidemiological surveillance, placing special emphasis on the study of reservoirs and bacterial virulence attributes.

Key-words: *Escherichia coli*, STEC, Shiga toxin, bovines, Rondônia, Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1) <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC - <i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i>).....	02
1.1.1) Sorogrupos e sorotipos de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC) associados a surtos.....	03
1.1.2) Fatores de virulência de STEC.....	04
1.1.2.1) Toxina Shiga.....	04
1.1.2.2) Lesão “ <i>attaching and effacing</i> ” (Lesão A/E).....	05
1.1.2.3) Enterohemolisina.....	07
1.2) Via de Patogênese da STEC.....	07
1.3) Aspectos clínicos e epidemiológicos da STEC em humanos.....	08
1.4) Reservatórios.....	09
1.5) Métodos diagnósticos e de tipagem para populações de <i>Escherichia coli</i>.....	11
1.6) Agrupamento filogenético.....	13
1.7) Impacto econômico e ambiental das doenças infecciosas zoonóticas.....	13
1.8) Papel do ambiente e do manejo na disseminação de STEC.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1) Objetivo geral.....	15
2.2) Objetivos específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
3.1) Animais em estudo.....	16
3.2) Amostras bacterianas.....	19
3.3) Coleta de dados clínico-epidemiológicos e de características das propriedades rurais.....	20
3.4) Métodos laboratoriais de investigação – análise molecular.....	20
3.4.1) Extração de DNA bacteriano.....	20
3.4.2) Amplificação simultânea dos genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> e <i>ehxA</i>	21
3.4.3) Amplificação simultânea dos genes <i>rfb</i> ₀₁₅₇ , <i>rfb</i> ₀₁₁₁ e <i>rfb</i> ₀₁₁₃	21
3.4.4) Amplificação simultânea dos genes da região LEE e suas variantes.....	22

3.4.5)	Amplificação simultânea dos genes <i>fliC_{h7}</i> e <i>rfbE</i>	23
3.4.6)	Amplificação Randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR).....	24
3.4.7)	Amplificação simultânea para o agrupamento filogenético das amostras de <i>E. coli</i> carreadoras dos genes <i>stx</i>	25
3.4.8)	Deteccção dos produtos de PCR.....	25
4.	RESULTADOS	27
4.1)	Análise bioquímica	27
4.1.1)	Análise bioquímica por estado.....	27
4.2)	PCR para deteção dos genes <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>eae</i> e <i>ehxA</i>	27
4.2.1)	Diagnóstico molecular de STEC.....	27
4.2.1.1)	Diagnóstico molecular de STEC por estado.....	28
4.2.2)	Prevalência dos genes relacionados à virulência de STEC (<i>eae</i> e <i>ehxA</i>).....	29
4.2.2.1)	Prevalência dos genes relacionados à virulência de STEC (<i>eae</i> e <i>ehxA</i>) por estado.....	30
4.2.3)	Perfis genéticos de virulência.....	31
4.2.3.1)	Perfis genéticos de virulência por estado.....	31
4.3)	PCR-sorogrupagem (<i>rfb</i>₀₁₅₇, <i>rfb</i>₀₁₁₁ e <i>rfb</i>₀₁₁₃)	33
4.3.1)	PCR-sorogrupagem por estado.....	33
4.4)	PCR-sorotipagem para deteção do sorotipo O157:H7	34
4.4.1)	PCR-sorotipagem por estado.....	34
4.5)	Tipagem da região LEE (<i>Locus of enterocyte effacement</i>)	35
4.5.1)	Tipagem da região LEE (<i>Locus of enterocyte effacement</i>) por estado.....	35
4.6)	PCR-triplex para agrupamento filogenético	37
4.6.1)	Filogrupagem por estado.....	38
4.7)	Amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR)	39
5.	DISCUSSÃO	55
5.1)	PCR-multiplex para diagnóstico molecular de STEC e caracterização de genes associados com virulência	56
5.2)	PCR-multiplex para tipagem da região LEE	59
5.3)	PCR-multiplex para deteção de sorogrupos e sorotipos associados com virulência	60

5.4) Agrupamento filogenético de STEC.....	62
5.5) Amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR).....	63
6. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS	
1) Questionário epidemiológico.....	79
2) Soluções.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de STEC nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.....	29
Tabela 2. Prevalência dos genes <i>eae</i> e <i>ehxA</i> por estado.....	30
Tabela 3. Prevalência dos perfis genéticos detectados entre as STEC isoladas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.....	32
Tabela 4. Prevalência das amostras STEC carreadoras dos genes <i>rfb</i> ₀₁₅₇ , <i>rfb</i> ₀₁₁₁ e <i>rfb</i> ₀₁₁₃ nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.....	34
Tabela 5. Prevalência das amostras STEC <i>rfbE</i> ₀₁₅₇₊ <i>flic</i> _{h7+} e <i>rfbE</i> ₀₁₅₇₊ por estado...35	
Tabela 6. Perfis genéticos da região LEE detectados entre as amostras de STEC isoladas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.....	36
Tabela 7. Perfil filogenético das amostras de STEC incluídas no estudo.....	37
Tabela 8. Perfil filogenético das amostras de STEC isoladas dos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.....	39
Tabela 9. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do estado do Rio de Janeiro.....	40
Tabela 10. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Corumbiaria, Rondônia.....	41
Tabela 11. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Ji-Paraná, Rondônia.....	41
Tabela 12. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Cacoal, Rondônia.....	43
Tabela 13. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Presidente Médice, Rondônia.....	44

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo.....	49
---	----

LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS

Quadros

Quadro 1. Relação dos bovinos do Município de Guapimirim-RJ.....	16
Quadro 2. Relação dos bovinos do Município de Cachoeira de Macacu-RJ.....	17
Quadro 3. Relação dos bovinos do Município de Presidente Médice-RO.....	17
Quadro 4. Relação dos bovinos do Município de Corumbiaria-RO.....	17
Quadro 5. Relação dos bovinos do Município de Ji-Paraná-RO.....	18
Quadro 6. Relação dos bovinos do Município de Cacoal-RO.....	19
Quadro 7. Iniciadores utilizados para amplificação simultânea de genes <i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> , <i>eaec</i> e <i>ehxA</i>	21
Quadro 8. Iniciadores utilizados para amplificação simultânea de genes <i>rfb₀₁₅₇</i> , <i>rfb_{0111e}</i> e <i>rfb₀₁₁₃</i>	22
Quadro 9. Iniciadores utilizados para amplificação simultânea dos genes <i>eaecα</i> , <i>eaecβ</i> , <i>eaecγ</i> , <i>tirα</i> , <i>tirβ</i> , <i>tirγ</i> , <i>espAα</i> , <i>espAβ</i> , <i>espAγ</i> , <i>espBα</i> , <i>espBβ</i> e <i>espBγ</i>	23
Quadro 10. Iniciadores utilizados para amplificação simultânea dos genes <i>fliC_{H7e}</i> e <i>rfbE₀₁₅₇</i>	24
Quadro 11. Iniciadores para amplificação randômica do DNA polimórfico.....	24
Quadro 12. Iniciadores de PCR-triplex para agrupamento filogenético de STEC.....	25

Gráficos

Gráfico 1. Proporção dos genes <i>stx</i> nas amostras de STEC por estado.....	29
---	----

Gráfico 2. Proporção de amostras STEC carreadoras dos genes <i>eae</i> e <i>ehxA</i> por estado.....	30
---	----

Figuras

Figura 1. Perfis eletroforéticos dos marcadores genéticos genes associados ao patotipo STEC.....	33
---	----

Figura 2. Perfis eletroforéticos de amostras STEC carreadoras dos genes <i>rfb₀₁₅₇</i> e <i>rfb₀₁₁₃</i>	34
--	----

Figura 3. Perfis eletroforéticos de amostras STEC carreadoras dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e do fragmento TspE4.C2.....	37
---	----

Figura 4. Dendrograma das amostras provenientes de Ji-Paraná-RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.....	45
--	----

Figura 5. Dendrograma das amostras provenientes de Corumbiaria-RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.....	46
--	----

Figura 6. Dendrograma das amostras provenientes de Presidente Médice-RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador 1290.....	46
---	----

Figura 7. Dendrograma das amostras provenientes do Cacoal - RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.....	47
---	----

Figura 8. Dendrograma das amostras provenientes do estado do Rio de Janeiro, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.....	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: *Aggregative adherence* (aderência agregativa)

A/E: *Attaching and effacing* (aderência e achatamento)

AIEC: *adherent invasive Escherichia coli*

aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

CH: Colite hemorrágica

DAEC: *Diffusely adhering Escherichia coli* (*Escherichia coli* de aderência difusa)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

dNTPs: *Deoxyribonucleotide triphosphates* (nucleotídeos trifosfatados)

eae: EPEC *attaching and effacing* (EPEC aderência e achatamento)

EAEC: *Enteraggative Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroagregativa)

EHEC: *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterohemorrágica)

Ehly: *Enterohaemolysin* (Enterohemolisina)

EIEC: *Enteroinvasive Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroinvasora)

EMB: *Eosin methylene blue agar* (agar eosina azul de metileno)

EPEC: *Enteropathogenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteropatogênica)

Esp: EPEC *secreted proteins*

ETEC: *Enterotoxigenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterotoxigênica)

ExPEC: *Escherichia coli* Extraintestinal

Gb3: Globotriosilceramida

Gb4: Globotetrasilceramida

HeLa: Células de linhagem de carcinoma cervical (Henrietta Lacks)

HEp-2: Células de linhagem de carcinoma epidermóide de laringe humana

LA: *Localized adherence* (aderência localizada)

LAL: *Localized adherence –like* (aderência localizada-like)

LEE: *Locus of enterocyte effacement*

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MILi: Motilidade, Indol e lisina descarboxilase

MLEE: *Multilocus enzyme electrophoresis*

NEMEC: *E. coli* associada ao quadro de meningite neonatal

PAI: *Pathogenicity islands* (ilhas de patogenicidade)

Pb: Pares de base

PCR: *Polymerase chain reaction* (reação da polimerase em cadeia)

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (eletroforese em campo pulsado)

RAPD: *Random amplification of polymorphic DNA* (amplificação randômica do DNA polimórfico)

rpm: rotações por minuto

SEPEC: *E. coli* associada ao quadro de sepse

SHU: Síndrome hemolítica urêmica

SLT: *Shiga-like toxin* (Toxina Shiga-like)

SMAC: *Sorbitol MacConkey agar* (ágar MacConkey sorbitol)

STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

stx: *Shiga toxin* (toxina Shiga)

Tir: *Translocated intimin receptor* (receptor de intimina translocado)

TSA: *Tryptic soy agar* (ágar de tripticaseína de soja)

TSB: *Tryptic soy broth* (caldo de tripticaseína de soja)

UPEC: *Escherichia coli* Uropatogênica

UV: Ultravioleta

VT: *Verotoxin* (Verotoxina)

1. INTRODUÇÃO

A espécie bacteriana *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez em 1885, pelo pediatra alemão Theodore Escherich, que a denominou *Bacterium coli commune* por ser um microrganismo comumente encontrado no trato intestinal de humanos e animais. Somente em 1945 foi reconhecido o potencial enteropatogênico dessa espécie, uma vez que essa bactéria foi associada com a doença diarreica infantil.¹ A espécie bacteriana pertence à família *Enterobacteriaceae*, é Gram negativa, anaeróbia facultativa, apresenta metabolismo tanto fermentativo quanto oxidativo, pode ser móvel ou imóvel e faz parte da microbiota intestinal de uma grande variedade de animais.^{2,3}

E. coli é genericamente categorizada em linhagens particulares como: *E. coli* comensal (colonizadores intestinais não-patogênicos), *E. coli* patogênica intestinal ou enteropatogênica (categorias diarreioagênicas) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), essa podendo estar associada com infecções ou síndromes específicas: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada ao quadro de sepse (SEPEC) e *E. coli* associada ao quadro de meningite neonatal (NEMEC).³ As cepas comensais podem atuar como agentes oportunistas causando infecções diversas em hospedeiros imunocomprometidos.^{4,5}

As linhagens de *Escherichia coli* que causam infecções intestinais ou entéricas nos seres humanos são atualmente classificadas nas principais categorias diarreioagênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). O que diferencia as linhagens pertencentes a cada categoria são as diferentes estratégias para provocar infecção, mediadas por fatores específicos de virulência, os quais são codificados por genes localizados em plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade ou em bacteriófagos.⁶

No Brasil são restritas as informações sobre a epidemiologia das infecções causadas pela *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga, mas casos esporádicos de diarreia em seres humanos provocados pela STEC já foram relatados, ocorrendo com maior frequência entre crianças menores de cinco anos.^{7,8} Os bovinos são reconhecidos como o principal reservatório desses microrganismos e, portanto, atuam como a principal fonte de infecção.² Uma vez eliminada através das fezes, a STEC é

disseminada de forma direta ou indireta, atingindo a cadeia alimentar dos seres humanos podendo causar graves doenças. Em nosso país, grande parte das informações sobre os aspectos da epidemiologia e virulência desses patógenos foram obtidas a partir de estudos concentrados na região sudeste.

O conhecimento das características fenotípicas e genotípicas das STEC, isoladas de rebanhos bovinos de regiões agropecuárias no estado de Rondônia e Rio de Janeiro, contribuirá para o esclarecimento da epidemiologia desse patógeno em nosso país, o que subsidiará ações de prevenção e controle de sua disseminação e, conseqüentemente, diminuição dos riscos de infecções ao ser humano.

1.1 *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC - Shiga toxin-producing *Escherichia coli*)

Escherichia coli produtora de toxina Shiga ou STEC constitui uma das categorias diarreiogênicas de *Escherichia coli* sendo caracterizada pela habilidade de produzir potentes citotoxinas que inibem a síntese proteica de células eucarióticas.

As STEC destacam-se pelo seu potencial zoonótico e geralmente os animais portadores destes microrganismos são assintomáticos. Atuam como uma importante causa de surtos de diarreia esporádica e epidemias, podendo se manifestar em quadros clínicos graves e ocasionar severas complicações sistêmicas como a anemia hemolítica e a síndrome hemolítica urêmica (SHU), caracterizada por insuficiência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, podendo até mesmo evoluir para a morte.⁵

A transmissão da STEC para humanos pode ocorrer através da ingestão de carne mal cozida ou crua; verduras, legumes e água contaminados; através do leite não pasteurizado e outros produtos lácteos; e também pelo contato direto com animais ou outras pessoas infectadas.^{9,10,11} A viabilidade de STEC nas fezes de animais pode variar de semanas a meses e sua persistência no solo favorece a infecção fazendo com que a exposição ambiental seja um fator de risco para a infecção humana.^{2,12}

O termo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) foi originalmente utilizado para classificar subpopulações de STEC consideradas altamente patogênicas e responsáveis por casos severos em seres humanos, sendo o sorotipo O157:H7 o

protótipo da categoria, considerado altamente patogênico, levando a colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica.¹³ As EHEC, além de produzirem a toxina Shiga, também possuem outros fatores de virulência, como o gene *eae*, codificador da intimina, adesina responsável pela íntima aderência bacteriana à célula hospedeira e o plasmídeo de 60MDa, conhecido como plasmídeo EHEC (EHEC-plasmid).⁵ Estudos posteriores revelaram que a ausência do gene *eae* não torna a cepa menos virulenta e o termo STEC vem sendo utilizado para classificar as *E. coli* produtoras de toxina Shiga.^{14,3}

As primeiras descrições sobre a associação entre *E. coli* e a produção de citotoxina ocorreu na década de 70 a partir de observações de que algumas cepas eram capazes de produzir uma toxina, referida como Verotoxina (VT), pois induzia um efeito citotóxico irreversível em células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde).¹⁵ Neste estudo, os autores relataram que das dez cepas que apresentavam o efeito citotóxico, sete eram isoladas de crianças com diarreia e pertenciam a diferentes sorogrupos (O18, O26, O111, O126 e O128) e uma cepa estava associada com diarreia em suínos.¹⁵ O'Brien e colaboradores (1982) identificaram entre as amostras de *E. coli* pertencentes a sorogrupos considerados EPEC, a produção de uma citotoxina letal para células Hela (células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano), cujo efeito era neutralizável por antisoros contra a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1, denominando-a então de *Shiga-like toxin*.¹⁶ Em 1996 Calderwood e colaboradores propuseram a nomenclatura toxina Shiga (Stx)/*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC).¹ Desde então, o crescente monitoramento para esse grupo de microrganismos permitiu detectar um aumento no número de surtos e a associação com a ingestão de alimentos contaminados por esses patógenos.

1.1.1 Sorogrupos e sorotipos de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) associados a surtos

O primeiro relato de surto causado por uma STEC envolveu o sorogrupo O157 e ocorreu nos Estados Unidos da América, nos estados de Oregon e Michigan em 1982. Estudos epidemiológicos revelaram que o surto ocorreu após a ingestão de carne de hambúrguer de uma rede de lanchonetes.¹⁷

Entre 1989 e 1990, outro surto causado por uma STEC O157:H7 ocorreu nos Estados Unidos, em Missouri, devido a ingestão de água contaminada.¹⁸ Na Austrália o primeiro surto causado por uma STEC, que foi associado ao sorotipo O111:H⁻, ocorreu em 1995, no qual 21 pacientes desenvolveram SHU. A ingestão de salsicha preparada com carne bovina foi identificada como a provável fonte de infecção.¹⁹ Em 1996, um surto ocorrido no Japão causado, envolveu 6.309 crianças de 62 escolas de Sakai, sendo 1.012 casos confirmados laboratorialmente, incluindo 197 casos de SHU e três óbitos.²⁰

Recentemente um surto causado por STEC ocorreu na Alemanha, entre maio e junho de 2011, por um sorotipo até então não envolvido, ocasionando 3.222 casos, dos quais 810 evoluíram para SHU. A amostra bacteriana foi caracterizada como pertencente ao sorotipo O104:H4 e portadora do gene *stx* variante 2. Características genéticas encontradas em outro patotipo da espécie, conhecido como *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), também foram detectadas nas amostras do surto, indicando que a cepa envolvida consiste de um híbrido STEC-EAEC.²¹

Estudos em STEC têm revelado variações nos padrões epidemiológicos das infecções causadas por esses microrganismos em diversas partes do mundo. No Brasil representam um problema de saúde pública para algumas regiões, entretanto, são poucos os relatos sobre as infecções causadas por STEC em humanos no país. As enteroinfecções por STEC relatadas geralmente são pertencentes aos sorogrupos O111 e O26, detectadas principalmente em crianças menores de cinco anos, apresentando quadros clínicos sem gravidade, porém, casos que evoluíram para quadros mais graves também têm sido relatados envolvendo sorotipos específicos.^{7,8}

1.1.2 Fatores de virulência de STEC

1.1.2.1 Toxina Shiga

As STEC são caracterizadas pela capacidade de produzir potentes citotoxinas que possuem a habilidade de inibir a síntese proteica em células eucarióticas.⁶ Estas toxinas podem ser chamadas tanto de Verotoxina (VT), devido à citotoxicidade em células Vero, como toxina Shiga (Stx) devido à grande homologia estrutural e funcional com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae*.² As Stx constituem o principal fator de virulência das STEC caracterizando dois grupos principais: Stx1, que difere em

apenas um aminoácido da toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* sorotipo 1; e Stx2 que possui uma similaridade em torno de 60% com Stx1 na sequência de aminoácidos.⁹ Ambas possuem diferentes variantes antigênicas que podem ou não estar associadas com doença severa. Uma única cepa pode possuir um ou mais genes *stx*, e a informação genética para a produção de Stx1 e Stx2 está localizada no genoma de bacteriófagos temperados do tipo lambda integrados no cromossoma da STEC.² A literatura descreve que as cepas que produzem apenas Stx2 são mais patogênicas do que as que só produzem Stx1 ou ambas, estando mais frequentemente associadas à SHU.⁶

Os membros da família Stx possuem uma estrutura proteica conservada, que consiste de uma subunidade A catalítica (32 kDa), que pode ser clivada proteolicamente resultando em dois peptídeos: A1, que apresenta atividade enzimática (N-glicosidase); e A2, que liga a subunidade A à subunidade B, esta última forma um pentâmero (5 monômeros de 7,7 kDa cada) que é responsável pela adesão da toxina aos receptores glicolipídicos presentes na membrana da célula eucariota alvo: globotriasilceramida (Gb3) para Stx1 e Stx2 e globotetrasilceramida (Gb4) para Stx2e.¹

As toxinas Stx apresentam atividades biológicas similares, mas são distintas antigenicamente, divergindo na sequência de aminoácidos da subunidade B alterando, desta forma, a afinidade pelo receptor celular.²²

1.1.2.2 Lesão “*attaching and effacing*” (Lesão A/E)

Além das Stx, as STEC podem estar envolvidas com uma aderência íntima que destrói as microvilosidades intestinais e induz a formação de uma estrutura em forma de pedestal caracterizando a lesão A/E (“*attaching and effacing*”). Estudos com células epiteliais em cultura revelaram que a lesão A/E envolve a ação conjunta da proteína de membrana externa intimina, que é codificada pelo gene *eae*, e de diversos genes.²³ O principal locus genético é governado pela ilha de patogenicidade conhecida como LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) que é organizada em operons policistrônicos denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5.²⁴ Os operons LEE1 a LEE3 codificam componentes estruturais do Sistema de Secreção Tipo III (Esc e Sep), o operon LEE4 codifica as proteínas envolvidas no sistema de translocação (EspA, EspB, EspD e SepL) e o operon LEE5 é responsável pelo sistema de aderência, que consiste na

proteína externa de membrana intimina e seu receptor (Tir), além de outras proteínas efetoras (EspF, EspG e Map).^{1,25}

O aparato de secreção é muito complexo, consistindo numa estrutura em formato de agulha que surge no interior do citoplasma da célula bacteriana e se estende através de suas membranas interna e externa, atravessando a membrana da célula epitelial. Através dessa estrutura, as proteínas secretadas são transferidas do citoplasma bacteriano até a célula hospedeira.²⁴ Durante a formação da lesão A/E, várias proteínas codificadas por LEE, (Tir, Map, EspF, EspG, EspH e EspZ), assim como as não codificadas por LEE – *non-LEE-encoded effectors* – (NleA/EspI, EspFu/TccP, EspJ, and Cif), são translocadas pelo aparato de secreção para dentro da célula epitelial.²⁵ A proteína Tir se insere na membrana da célula hospedeira onde atua como receptor para a intimina presente na superfície da célula bacteriana. Tir e as outras proteínas secretadas ativam uma cascata de sinais que resultam em uma mudança na conformação da célula epitelial do intestino e conseqüentemente na fisiologia celular, causando diarreia e inflamação.^{13,24}

O gene *eae* apresenta grande heterogeneidade na região 3' que codifica os 280 aminoácidos da porção C-terminal (envolvidos no mecanismo de ligação entre o enterócito e o receptor Tir). Mudanças na sequência desses aminoácidos provocam a ocorrência de variantes antigênicas.^{26,24} Baseando-se nessas variações sequenciais e antigênicas, foram identificadas diversas variantes da intimina, presentes em cepas de STEC e EPEC de origem humana e animal, como: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ (esta estando associada a sorotipos de STEC altamente patogênicas, como a O157:H7 e O145:H⁻), $\gamma 2/\theta$, δ/κ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\epsilon 5$, $\zeta 1$, $\zeta 3$, $\eta 1$, $\eta 2$, $\iota 1$ -A, $\iota 1$ -B, $\iota 1$ -C, $\iota 2$, λ , μ , ν , \omicron , π , ρ , σ .^{3,27,24} Variantes para os genes *tir* (α , β , γ e θ), *espA* (α , β e γ), *espB* (α , β e γ) e *espD* (α , β e γ) também já foram descritos.^{26,28}

Apesar da lesão A/E não ser essencial para a evolução da colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em humanos, a presença do gene *eae* em cepas LEE-positivas é um grande fator de risco para a ocorrência dessas patologias.²⁹ Entretanto, muitas STEC LEE-positivas não estão associadas com a SHU e algumas moléculas efetoras codificadas fora da região LEE (*nle* – *non-LEE-encoded effectors*), e secretadas pelo sistema de secreção Tipo III, estão relacionadas aos sorogrupos de STEC não O157 que causam a SHU.³⁰

1.1.2.3 Enterohemolisina

A enterohemolisina (Ehly) é uma proteína monomérica que se insere na membrana plasmática das células eucariotas e forma poros. Ehly é codificada pelo gene *ehxA*, localizado no megaplasmídeo de 60MDa.³¹

A produção de Ehly pode ocorrer em cepas de STEC *eae*-positivas e *eae*-negativas. A resposta humoral a essa proteína, detectada no soro de pacientes em recuperação da SHU, demonstrou sua expressão durante a infecção, sendo a primeira evidência da Ehly como um fator de virulência de STEC.³² Não se sabe ao certo seu papel na patogênese da colite hemorrágica e da síndrome hemolítica urêmica, mas estudos sugerem que a enterohemolisina, ao provocar a lise de eritrócitos, promove a liberação da hemoglobina, que é utilizada como fonte de ferro para STEC, favorecendo sua multiplicação no intestino.³³ Em um estudo feito por Taneike e colaboradores (2002), cepas de *E. coli* (STEC) carreadoras de um operon clonado para enterohemolisina induziram a produção da citosina IL-1 β , que atua fazendo uma regulação ascendente no receptor Gb3 pra Stx.³⁴ Portanto, a enterohemolisina poderia aumentar os efeitos danosos da toxina Shiga nas células endoteliais. A liberação dessa citosina não foi observada nas cepas isogênicas HlyA-negativas, com uma mutação no gene *hlyA*. Entretanto, não existem dados que comprovem seu papel na anemia hemolítica e SHU.³⁴

1.2 Via de patogênese de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

A STEC necessita ultrapassar alguns mecanismos de defesa do organismo para colonizar o intestino e como primeira barreira se depara com o baixo pH gástrico. Entretanto, devido a característica de resistência à acidez de alguns sorogrupos, (incluindo o O157), esses microrganismos resistem nesse ambiente.^{6,24} A bactéria passa pelo intestino delgado e chega ao cólon. O mecanismo de aderência em cepas LEE-negativas ainda é pouco compreendido, mas nas cepas que possuem a região LEE, a adesão ao enterócito ocorre através do mecanismo “*attaching and effacing*” (A/E), que induz mudanças estruturais na célula epitelial, aderência íntima e consequente destruição das microvilosidades intestinais, com formação de pedestais ricos em actina no citoplasma da célula hospedeira infectada.⁶

A toxina Shiga é o principal fator nas patologias causadas pelas STEC em seres humanos. Localmente sua produção leva a danos nos vasos do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta ou colite hemorrágica. Ao cair na corrente sanguínea, Stx se liga aos receptores presentes no endotélio vascular, promovendo danos principalmente aos rins e ao sistema nervoso central, podendo levar ao desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica.^{6,24}

Após se ligar ao receptor Gb3, a Stx é endocitada e transportada por meio de vesículas revestidas pela proteína clatrina para o citoplasma da célula, onde podem se fundir com vesículas lisossomais e serem destruídas.⁶ No caso de células que são suscetíveis à toxina, as vesículas são transportadas até o retículo endoplasmático via Complexo de Golgi e, durante este processo, a subunidade A é clivada pela enzima furina, gerando os fragmentos A1 e A2. O fragmento A1 livre tem atividade RNA N-glicosidase e interage com a unidade 60S do ribossomo. A subunidade A1 remove um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA eucariótico, promovendo a inibição da síntese proteica, causando a morte celular.⁶

1.3 Aspectos clínicos e epidemiológicos de STEC em humanos

Na América Latina, as infecções por STEC são endêmicas e contribuem para a síndrome diarreica aguda em crianças com menos de cinco anos de idade, sendo responsável por 2% do total de casos de diarreia aguda, e em alguns estudos correspondem a 20-30% dos casos de diarreia sanguinolenta.³⁵

No Brasil, o percentual de STEC isolada a partir de diarreia em humanos varia dependendo da região estudada. Em um estudo feito com 470 crianças em Porto Velho, Rondônia, as STEC corresponderam a 0,6% dos enteropatógenos encontrados.³⁶ Já em estudos feitos no Rio de Janeiro, a prevalência de STEC variou de 0 a 0,9%.^{37,38}

O espectro clínico das STEC é amplo podendo se manifestar por meio de casos assintomáticos, diarreia aquosa, colite hemorrágica ou mesmo severas complicações sistêmicas, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU). A SHU caracteriza-se por falência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia.¹³

O período de incubação é de 3 a 4 dias, após esse período uma alta proporção de pacientes apresentam diarreia aquosa. Cerca de 30% destes evoluem para diarreia

sanguinolenta, com presença de muco e vestígios de sangue nas fezes, em torno do quinto a sexto dia, com uma minoria apresentando colite hemorrágica.¹³ Ausência de febre ou uma febre baixa é observada. Cólicas abdominais intensas são frequentes podendo haver vômito e irritabilidade.¹³ Em alguns pacientes os sintomas da SHU aparecem no sexto ou oitavo dia após o início da diarreia e incluem: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. Apesar dos rins serem o alvo principal, outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central, pulmões, pâncreas e coração, podem ser afetados.¹³

1.4 Reservatórios

Reservatórios animais têm um papel relevante na epidemiologia das infecções causadas por STEC. O termo pode ser definido como uma ou mais populações ou ambientes interligados epidemiologicamente, no qual o patógeno pode se multiplicar, se manter e onde através do qual a infecção pode ser transmitida para a população suscetível.³⁹

As STEC podem ser encontradas no trato gastrointestinal de uma variedade de animais como: suínos, ovinos, caprinos, cavalos, aves e até entre cães e gatos. Os bovinos são considerados o principal reservatório das STEC constituindo uma importante fonte de infecção da *E. coli* O157:H7. Os bovinos são identificados como excretores assintomáticos do microrganismo que é transitório em sua microbiota intestinal.² Em estudo conduzido por Brees e colaboradores (2000), não foi observado a presença do receptor globotriosilceramida (Gb3) para Stx no trato gastrointestinal de bovinos, apenas no cérebro e no rim. A falta de receptores vasculares para Stx nesses animais explicaria o não desenvolvimento da doença entérica.⁴⁰

STEC é comumente isolada em bovinos sadios e em um estudo feito no Brasil por Cerqueira e colaboradores (1999), 139 das 197 (71%) amostras fecais obtidas de bovinos no estado do Rio de Janeiro, continham *Escherichia coli* carreadora do gene *stx*, sendo mais frequente em gado de leite (82%, 99/121).⁴¹ Em estudo conduzido por Tristão e colaboradores (2007), 1562 das 2402 (65%) amostras fecais de bovinos, coletadas no estado do Rio de Janeiro e em 279 de 994 (28%) das amostras fecais coletadas de bovinos no Rio Grande do Sul, apresentavam *E. coli* carreadora do gene *stx*.⁴²

A presença da STEC O157 em fezes de gado parece ser influenciada pela sua idade. Em um estudo feito por Cray e Moon (1995) com bovinos, onde se realizou a infecção experimental pela STEC O157:H7 nesses animais, confirmou-se que a excreção desse microrganismo é mais longa e intensa em bezerros do que nos animais adultos, o que se supõe ser devido às diferenças fisiológicas na função ruminal relacionadas à idade dos animais.⁴³ Bovinos adultos possuem o rumem mais desenvolvido, com alta concentração de ácidos graxos voláteis e baixo pH, o que pode atuar como inibidor da proliferação bacteriana.⁴³ A recuperação de STEC ocorreu a partir do conteúdo intestinal de todos os animais infectados. Alguns órgãos linfoides, como tonsilas e linfonodos mesentéricos, apresentaram cultura positiva em alguns bezerros, mas não em adultos. Não houve disseminação para outros órgãos. O experimento mostrou ainda que a primo infecção não previne a reinfecção.⁴³ O desmame parece também influenciar a eliminação fecal do microrganismo pelos bezerros, sendo esta maior após o desmame. O estresse causado pelo confinamento dos bezerros associado ao desmame são importantes fatores responsáveis por esse aumento na eliminação fecal do microrganismo.⁴⁴ A temperatura ambiente é outro fator que parece contribuir para a excreção de STEC O157, sendo esta mais frequente nos meses mais quentes do ano e menos intensa no inverno.^{45,46}

Outros animais podem ser carreadores de STEC como, por exemplo, ovinos saudáveis, que também atuam como reservatórios de STEC e EPEC atípica, sendo assim de grande relevância o seu papel como fonte de infecção.⁴⁷ Algumas cepas como as pertencentes ao sorotipo O5:H são predominantemente isoladas a partir de ovinos e raramente do gado.^{48,49,50} Cabras também são importantes reservatórios e o sorotipo O157:H7, já foi isolado a partir de leite de cabra não pasteurizado em um surto ocorrido na República Checa.⁵¹

Apesar da maioria dos animais serem carreadores assintomáticos, alguns animais podem manifestar quadro clínico como, por exemplo, na doença do edema, que ocorre em leitões no pós desmame, onde STEC é incriminada como o seu agente etiológico.¹³

O primeiro estudo feito com búfalos na América do Sul identificou 20 sorotipos distintos de STEC, sendo que mais de 50% destes estão associados com a doença em humanos.⁵²

Cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga também já foram isoladas a partir de dejetos de aves, como pombos e gaivotas.^{53,54} Em um estudo feito com galinhas poedeiras verificou-se a presença de STEC O157:H7, isolada a partir de swabs cloacais, indicando esses animais como potenciais reservatórios de STEC.⁵⁵

Animais selvagens/silvestres também já foram descritos como reservatórios de STEC.^{56,57}

1.5 Métodos diagnósticos e de tipagem para populações de *Escherichia coli*

O diagnóstico microbiológico convencional de populações bacterianas envolve o isolamento do microrganismo e sua caracterização fenotípica como a tipagem sorológica, ensaios enzimáticos e de citotoxicidade em cultura celular, testes de sensibilidade, entre outros. Porém, nas últimas décadas de pesquisa, várias técnicas de diagnóstico e tipagem baseadas na análise direta e indireta do polimorfismo genômico foram desenvolvidas, possibilitando elucidar de forma mais precisa, a epidemiologia, mecanismos de virulência, a diversidade e a estrutura genética de populações de *E. coli*.^{58,59}

Para o isolamento e identificação presuntiva de *E. coli*, podem ser utilizados meios de cultura de baixa seletividade como o ágar MacConkey e o EMB/Teague, utilizados para diferenciação de colônias sugestivas de *Escherichia coli* fermentadoras ou não de lactose.⁶⁰ O ágar MacConkey sorbitol (SMAC) é diferenciado do ágar MacConkey tradicional devido a substituição da lactose pelo sorbitol e é um meio indicado para a detecção de colônias bacterianas não fermentadoras de sorbitol.

Para o estudo dos mecanismos pelos quais os patógenos entéricos interagem com as células do hospedeiro *in vivo*, utilizam-se ensaios *in vitro* empregando células epiteliais em cultura como as células HeLa (cérvis humana), Caco-2 (cólono humano), HEp-2 (laringe humana), T84 (cólono humano) e Henle 407 (intestino delgado humano)⁶¹. Ensaios empregando células epiteliais em cultura têm permitido detectar a expressão de padrões de aderência em populações de *E. coli* descritos como: aderência localizada (LA), aderência agregativa (AA), aderência localizada-like (LAL), e aderência difusa (DA)⁶¹. O ensaio de citotoxicidade também pode ser feito em cultura celular empregando células Vero, que são sensíveis às toxinas Shiga devido à presença de um grande número de receptores (Gb3 e Gb4) para Stx nessas células.⁶

A caracterização antigênica é um método fenotípico de tipagem de *Escherichia coli* criado por Kauffman em 1944, que permite sua classificação em sorogrupos e sorotipos com base em dois antígenos principais: antígenos O ou somáticos (sorogrupos), e antígenos flagelares ou H, que em combinação com os antígenos O, definem os sorotipos. *E. coli* também pode expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogênese.¹ Os antígenos somáticos “O” são termoestáveis e correspondem a porção polissacarídica da membrana externa; os antígenos flagelares “H” são termolábeis e correspondem às proteínas dos flagelos; e os antígenos “K”, de natureza proteica ou polissacarídica, são componentes capsulares.²²

Outro método fenotípico utilizado para diagnóstico da STEC são os ensaios imunológicos, permitindo a detecção das toxinas Stx1 e Stx2.⁶²

As técnicas moleculares baseadas na hibridização e amplificação de sequências genéticas específicas têm sido instrumentos importantes para a detecção de uma grande variedade de microrganismos, incluindo as subpopulações de *Escherichia coli*.^{63,64} A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico e tipagem de STEC e é baseada na amplificação de sequências específicas de DNA. Esta técnica apresenta dentre as suas vantagens facilidade e rapidez de execução, baixo custo, especificidade e sensibilidade.⁶ Variantes metodológicas como a amplificação randômica do DNA polimórfico, conhecida pela sigla RAPD-PCR (“*Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction*”), tem sido utilizada no estudo da diversidade destes microrganismos e possibilitado observar uma estreita associação de padrões eletroforéticos com parâmetros clínico-epidemiológicos.⁶⁵ Particularmente para populações de *E. coli*, o RAPD-PCR tem se mostrado um método de tipagem com elevado potencial discriminatório, possibilitando detectar a diversidade genética de populações bacterianas e a inter-relação entre amostras epidemiologicamente relacionadas.^{59,66,67}

O emprego da técnica de PCR tem se mostrado também muito útil como um instrumento alternativo de classificação filogenética de populações de *E. coli*, proporcionando relevantes esclarecimentos sobre a virulência e a evolução de linhagens patogênicas.^{68,69}

A eletroforese em campo pulsado, conhecida pela sigla PFGE (“*Pulsed Field Gel Electrophoresis*”), é também um dos sistemas empregados para a tipagem destes microrganismos. Este método molecular tem como base o estudo da diversidade genética e, com o auxílio de programas específicos, permite investigar as relações de clonalidade entre diferentes amostras, contribuindo para a elucidação dos aspectos biológicos e epidemiológicos desses agentes infecciosos.^{70,71}

1.6 Agrupamento filogenético

A análise filogenética tem permitido identificar linhagens patogênicas, potencial de virulência e diversidade em populações de *E. coli* de origem diversa, isoladas de uma grande variedade de hospedeiros, ambientes e regiões geográficas. Estudos evolucionários com *E. coli* empregando uma coleção de referência (ECOR) levou ao desenvolvimento de um método rápido e alternativo que permitiu verificar que populações bacterianas da espécie, comensais ou patogênicas, podem ser divididas em quatro principais grupos designados A, B1, B2 e D.^{68,69} Esses grupos filogenéticos parecem diferir em importantes aspectos relacionados à biologia de suas populações microbianas. Linhagens patogênicas de *E. coli* agentes de doenças extra-intestinais têm sido classificadas como pertencentes ao grupo D e, em sua maioria, ao grupo B2, enquanto as comensais e agentes de doença diarreica são normalmente encontradas como membros dos grupos A, B1 e D.^{72,73,74} STEC, importante agente de doença diarreica, costuma ser enquadrada principalmente nos grupos B1 e A, mas também pode ser encontrada, em menor proporção, nos outros dois grupos.^{75,76}

Amostras de *E. coli* pertencentes a cada um destes quatro grupos filogenéticos diferem em importantes características relacionadas à biologia de suas populações como habilidade para explorar diferentes açúcares, perfis de resistência a antimicrobianos e taxas de crescimento de acordo com variações de temperatura.⁷⁷ Os grupos A e B1 são considerados grupos mais estreitamente relacionados e o grupo B2 é considerado por alguns pesquisadores como representante de uma linhagem ancestral de *E. coli*.⁷⁴

1.7 Impacto econômico e ambiental das doenças infecciosas zoonóticas

As zoonoses têm um papel relevante para a emergência de doenças infecciosas em seres humanos.^{78,79} A transmissão de patógenos de outras espécies de seres vivos é uma consequência da atividade humana e de nosso relacionamento com os animais e o

meio ambiente. Fatores ecológicos, demográficos e ambientais estão entre os principais envolvidos para a emergência de novas doenças.⁸⁰

Diversas zoonoses surgiram como resultado do processo de domesticação a que muitos animais foram submetidos. A maior demanda por produtos de origem animal, consequência da civilização, promoveu a intensificação da produção, aumentando o risco de disseminação de doenças infecciosas.⁷⁹ Esse aumento do consumo gerou um grande impacto no meio ambiente, devido à criação de mais espaço e novas práticas de produção animal, levando a invasão e destruição das florestas, aumento do comércio e mercado público de animais vivos, além da caça e consumo de animais selvagens.⁸¹

As doenças infecciosas emergentes também são responsáveis por um grande impacto econômico e social, não só no Brasil, como em todo mundo.⁸² As zoonoses, além de promoverem diminuição da produtividade dos rebanhos, geram gastos com medidas de contenção e implementação de estratégias para evitar a recontaminação, eliminação dos animais infectados, perda de novos mercados ou de mercados já conquistados, perda de postos de trabalho devido à paralização das atividades, gastos com a saúde familiar e pública, entre outros.⁸¹

1.8 Papel do ambiente e do manejo na disseminação de STEC

Os ruminantes, em especial os bovinos, são carreadores assintomáticos de STEC, e excretam esse microrganismo naturalmente em suas fezes. Um dos sorotipos de maior relevância para a indústria láctea é o O157:H7, por sua alta virulência devido a baixa dose infectante.⁸³ A falta de higiene em propriedades produtoras de leite se torna um potencial risco para a contaminação, já que produtos lácteos oferecem condições favoráveis para a proliferação desse agente.⁸³ Para reduzir a contaminação ambiental por STEC é necessário um manejo adequado dos dejetos dos bovinos, limpeza e desinfecção de baias, comedouros e bebedouros, sempre disponibilizando água potável para os animais.⁸⁴ Além disso, é importante evitar a introdução de novos animais no rebanho, principalmente bezerros e novilhas, sem que estes passem antes por um período de quarentena e controlar o contato entre bezerros e vacas, assim como a presença de animais de outras espécies, domésticos ou selvagens, que podem atuar como possíveis vetores.^{84,85}

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência e as características biogenéticas de *Escherichia coli* carreadora dos genes *stx* (STEC) em amostras fecais de bovinos de regiões agropecuárias localizadas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.

2.2 Objetivos específicos:

1. Detectar a presença de *Escherichia coli* carreadora dos genes *stx* nos estados de Rondônia e Rio de Janeiro através do diagnóstico molecular.
2. Detecção de marcadores genéticos de virulência associados ao patotipo STEC.
3. Detecção dos sorogrupos O111, O113 e O157 entre as amostras de *E. coli* carreadoras de *stx*.
4. Detecção do sorotipo O157:H7 entre as amostras de *E. coli* carreadoras de *stx* diagnosticadas como pertencentes ao sorogrupo O157 através de técnica molecular.
5. Avaliar a diversidade genética, estrutura clonal e relações genéticas entre as subpopulações bacterianas carreadoras dos genes *stx*, assim como da ocorrência de padrões eletroforéticos e/ou variantes grupo-específicos através da técnica de análise do polimorfismo dos segmentos de DNA obtidos por amplificação randômica (RAPD-PCR).
6. Realização da filotipagem para determinar a presença de linhagens patogênicas, potencial de virulência e diversidade em populações de *E. coli* carreadoras dos genes *stx*.
7. Avaliar comparativamente as características bacterianas investigadas, considerando os aspectos clínico-epidemiológicos dos bovinos e as características das propriedades incluídas no estudo.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais em estudo

O estudo incluiu amostras bacterianas previamente isoladas de 58 bovinos, pertencentes a oito propriedades rurais, localizadas em regiões agropecuárias nos estados do Rio de Janeiro (duas propriedades com 20 bovinos no total) e de Rondônia (seis propriedades com 38 bovinos no total). No Rio de Janeiro as propriedades pesquisadas foram: Fazenda Ouro Branco, localizada no município de Guapimirim e Jororó do Sertão, localizada em Cachoeira do Macacu. No estado de Rondônia as propriedades pesquisadas foram: Estância Laiz, localizada em Presidente Médice; Fazenda Ibituruna, Fazenda Santa Luzia e Sítio Belo Vista, todas localizadas no município de Ji-Paraná; Fazenda 7 de Setembro, localizada em Corumbiaria; e Estância Icaraíma, localizada no município de Cacoal (Quadros 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Em ambos os estados a coleta das amostras fecais foi feita após a emissão espontânea por bovinos de um mês a 15 anos de idade, com (n=2) ou sem (n=56) enteropatias, pertencentes a propriedades rurais leiteiras, contendo ou não sala de ordenha (Quadros 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Após a coleta as amostras fecais foram inoculadas e transportadas em meio Cary Blair para processamento no laboratório.

Quadro 1. Relação dos bovinos do Município de Guapimirim-RJ

Bovinos	Propriedade	Idade	Tipo de ordenha	Sala de ordenha	Enteropatia
B001	Fazenda Ouro Branco	5 anos	MEC	S	A
B002	Fazenda Ouro Branco	3 anos	MEC	S	A
B003	Fazenda Ouro Branco	9 anos	MEC	S	A
B004	Fazenda Ouro Branco	4 anos	MEC	S	A
B005	Fazenda Ouro Branco	5 anos	MEC	S	A
B006	Fazenda Ouro Branco	1 mês	MEC	S	P
B007	Fazenda Ouro Branco	4 anos	MEC	S	A
B008	Fazenda Ouro Branco	4 meses	MEC	S	A
B009	Fazenda Ouro Branco	1 mês	MEC	S	A

Legenda. MEC (mecânica), S (sim), A (ausente), P (presente).

Quadro 2. Relação dos bovinos do Município de Cachoeira de Macacu-RJ.

Bovinos	Propriedade	Idade	Tipo de ordenha	Sala de ordenha	Enteropatia
B010	Jororó do Sertão	8 anos	MA	S	A
B011	Jororó do Sertão	8 anos	MA	S	A
B012	Jororó do Sertão	4 anos	MA	S	A
B013	Jororó do Sertão	6 anos	MA	S	A
B014	Jororó do Sertão	3 anos	MA	S	A
B015	Jororó do Sertão	3 anos	MA	S	A
B016	Jororó do Sertão	2 meses	MA	S	A
B017	Jororó do Sertão	3 meses	MA	S	A
B018	Jororó do Sertão	2 meses	MA	S	A
B019	Jororó do Sertão	2 meses	MA	S	A
B020	Jororó do Sertão	2 meses	MA	S	A

Legenda. MA (manual), S (sim), A (ausente).

Quadro 3. Relação dos bovinos do Município de Presidente Médice-RO.

Bovinos	Propriedade	Idade	Tipo de ordenha	Sala de ordenha	Enteropatia
B026	Estância Laiz	5 anos	MA	N	A
B027	Estância Laiz	6 anos	MA	N	A
B028	Estância Laiz	5 anos	MA	N	A
B029	Estância Laiz	5 anos	MA	N	A

Legenda. MA (manual), N (não), A (ausente).

Quadro 4. Relação dos bovinos do Município de Corumbiaria-RO.

Bovinos	Propriedade	Idade	Tipo de ordenha	Sala de ordenha	Enteropatia
B030	Fazenda 7 de setembro	5 anos	MA	N	A
B031	Fazenda 7 de setembro	5 anos	MA	N	A
B032	Fazenda 7 de setembro	6 anos	MA	N	A
B033	Fazenda 7 de setembro	6 anos	MA	N	A
B034	Fazenda 7 de setembro	6 anos	MA	N	A

Legenda. MA (manual), N (não), A (ausente).

Quadro 5. Relação dos bovinos do Município de Ji-Paraná-RO.

Bovinos	Propriedade	Idade	Tipo de ordenha	Sala de ordenha	Enteropatia
B021	Fazenda Ibituruna	5 anos	MA	N	A
B022	Fazenda Ibituruna	9 anos	MA	N	P
B023	Fazenda Ibituruna	12 anos	MA	N	A
B024	Fazenda Ibituruna	8 anos	MA	N	A
B025	Fazenda Ibituruna	7 anos	MA	N	A
B043	Fazenda Santa Luzia	7 anos	MA	N	A
B044	Fazenda Santa Luzia	5 anos	MA	N	A
B045	Fazenda Santa Luzia	5 anos	MA	N	A
B046	Fazenda Santa Luzia	5 anos	MA	N	A
B047	Fazenda Santa Luzia	7 anos	MA	N	A
B048	Sítio Bela Vista	8 anos	MA	N	A
B049	Sítio Bela Vista	8 anos	MA	N	A
B050	Sítio Bela Vista	10 anos	MA	N	A
B051	Sítio Bela Vista	6 anos	MA	N	A
B052	Sítio Bela Vista	8 anos	MA	N	A
B053	Sítio Bela Vista	10 anos	MA	N	A
B054	Sítio Bela Vista	8 anos	MA	N	A
B055	Sítio Bela Vista	9 anos	MA	N	A
B056	Sítio Bela Vista	10 anos	MA	N	A
B057	Sítio Bela Vista	6 anos	MA	N	A
B058	Sítio Bela Vista	6 anos	MA	N	A

Legenda. MA (manual), N (não), A (ausente), P (presente).

Quadro 6. Relação dos bovinos do Município de Cacoal-RO.

Bovinos	Propriedade	Idade	Tipo de ordenha	Sala de ordenha	Enteropatia
B035	Estância Icaraíma	5 anos	MA	N	A
B036	Estância Icaraíma	4 anos	MA	N	A
B037	Estância Icaraíma	8 anos	MA	N	A
B038	Estância Icaraíma	7 anos	MA	N	A
B039	Estância Icaraíma	5 anos	MA	N	A
B040	Estância Icaraíma	7 anos	MA	N	A
B041	Estância Icaraíma	8 anos	MA	N	A
B042	Estância Icaraíma	15 anos	MA	N	A

Legenda. MA (manual), N (não), A (ausente).

3.2 Amostras bacterianas

Foram incluídas no estudo um total de 301 amostras de *E. coli*, sendo 136 provenientes de 20 bovinos estado do Rio de Janeiro e 165 isoladas de 37 bovinos do estado de Rondônia.

Resumidamente, as amostras fecais foram semeadas nos meios seletivos para enterobactérias ágar azul de metileno (EMB - Difco[®]) e ágar MacConkey Sorbitol (Difco[®]). As colônias bacterianas foram selecionadas com base nas características morfo-fisiológicas sugestivas da espécie e submetidas a provas bioquímicas utilizando-se os meios EPM, MILi e Citrato de Simmons (Probac do Brasil[®]) para a identificação da espécie bacteriana. No meio EPM o padrão bioquímico para *E. coli* consiste de produção de gás em glicose (+), utilização da glicose (+), produção de sulfeto de hidrogênio (-), hidrólise da uréia (-) e desaminação do triptofano (-). No meio MILi é observada motilidade (+/-), produção de indol (+) e descarboxilação de lisina (+/-). Em 99% dos casos a *E. coli* não utiliza o citrato como fonte de carbono.⁸⁶

As amostras bacterianas identificadas como *Escherichia coli* foram estocadas, congeladas a -20°C em caldo tripticaseína de soja (TSB-BBL), acrescido de 15% (v/v) de glicerol. A cada teste foram avaliados o grau de pureza e a viabilidade das células bacterianas.

3.3 Coleta de dados clínico-epidemiológicos dos bovinos e de características das propriedades

Informações sobre a idade dos animais, aspectos clínicos relevantes (presença ou ausência de enteropatias), além das características sobre a infraestrutura e condições sanitárias das propriedades rurais, foram obtidas através de um questionário epidemiológico (Anexo 1) aplicado na ocasião da coleta do material e serão consideradas neste estudo.

No estado do Rio de Janeiro, após a coleta, observou-se que a idade dos bovinos variou de um mês a nove anos de idade e somente um bovino (B006, pertencente à Fazenda Ouro Branco localizada em Guapimirim) apresentou enteropatia. Tanto a propriedade Fazenda Ouro Branco, localizada em Guapimirim quanto à propriedade Jororó do Sertão, localizada em Cachoeira de Macacu, possuíam sala de ordenha, mas somente na Fazenda Ouro Branco a ordenha era feita de forma mecanizada (Quadros 1 e 2).

No estado de Rondônia a idade dos bovinos variou de quatro a 15 anos e somente um animal (B022, pertencente à Fazenda Ibituruna, localizada em Ji-Paraná) apresentou enteropatia. Em todas as cinco propriedades localizadas nos quatro diferentes municípios de Rondônia a ordenha era feita de forma manual e nenhuma possuía sala de ordenha (Quadros 3, 4, 5 e 6).

3.4 Métodos laboratoriais de investigação – análise molecular

3.4.1 Extração de DNA bacteriano

Para a extração do DNA as amostras foram semeadas em ágar de tripticaseína de soja (TSA - Difco®) e incubadas a 37°C por 18-24 horas. Após o período de crescimento, as células bacterianas foram ressuspensas em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 0,1mM, H₂O q.s.p. - 100mL, pH 7.5), submetido à fervura por 10 minutos e centrifugado a 12.000 rpm por cerca de 1 minuto. Os produtos da extração de DNA bacteriano foram usados como fonte de DNA para as reações de PCR de amplificação dos genes *stx₁*, *stx₂*, *eae*, *ehxA*, *rfb₀₁₁₃*, *rfb₀₁₅₇*, *rfb₀₁₁₁*, *rfbE₀₁₅₇*, *fliC_{h7}* e para os marcadores genéticos *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2.

3.4.2 Amplificação simultânea dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehxA*

Todas as amostras bacterianas do estudo (n=301) foram submetidas às reações de amplificação para a detecção dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehxA* segundo recomendações de Paton e Paton (1998).⁸⁷ A reação de PCR foi realizada utilizando-se uma mistura contendo uma alíquota de 2µL de DNA, 250nM de cada primer, 200µM de desoxinucleotídeos trifosfato (DNTP), 1U de *Taq* Polimerase, em 10mM Tris-HCL (pH 8,3), 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 0,1% Tween 20 e 0,1% Nonidet P-40. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf®) e submetida a 35 ciclos, cada um consistindo de 1 min a 95°C; 2 min a 65°C para os primeiros 10 ciclos, diminuindo para 60°C no ciclo 15; e 1.5 min a 72°C, aumentando para 2.5 min a partir do ciclo 25 até o 35. Como controles de reação foram utilizadas as cepas ATCC E30138 (*stx*₂+ *eae*+ *ehxA*+) e E40705 (*stx*₁+ *eae*+ *ehxA*+). As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se no quadro 7.

Quadro 7: Iniciadores utilizados para amplificação simultânea de genes *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehxA*.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do fragmento (pb)
Stx ₁ F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>stx</i> ₁	180
Stx ₁ R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	<i>stx</i> ₁	
Stx ₂ F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	<i>stx</i> ₂	255
Stx ₂ R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	<i>stx</i> ₂	
Eae F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i>	384
Eae R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	<i>eae</i>	
EhxA F	GATCATCAAGCGTACGTTCC	<i>ehxA</i>	534
EhxA R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	<i>ehxA</i>	

3.4.3 Amplificação simultânea dos genes *rfb*₀₁₅₇, *rfb*₀₁₁₁ e *rfb*₀₁₁₃

As amostras *stx*+ (n=167) foram submetidas às reações de amplificação para a detecção dos genes *rfb*₀₁₅₇, *rfb*₀₁₁₁ e *rfb*₀₁₁₃ segundo recomendações de Paton e Paton (1999).⁸⁸ A reação de PCR foi realizada utilizando-se uma mistura contendo uma alíquota de 2µL de DNA, 250nM de cada primer, 200µM de desoxinucleotídeos trifosfato (DNTP), 1U de *Taq* Polimerase, em 10mM Tris-HCL (pH 8,3), 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 0,1% Tween 20 e 0,1% Nonidet P-40. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf®) e submetida a 35 ciclos, cada um

consistindo de 1 min à 95°C; 2 min a 65°C para os primeiros 10 ciclos, diminuindo para 60°C no ciclo 15; e 1.5 min a 72°C, aumentando para 2.5 min a partir do ciclo 25 até o 35. Como controles de reação foram utilizadas a cepa ATCC E30138 (*rfbE*₀₁₅₇₊) e a amostra clínica 77I (*rfb*₀₁₁₃₊). As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se no quadro 8.

Quadro 8: Iniciadores utilizados para amplificação simultânea de genes *rfb*₀₁₅₇, *rfb*₀₁₁₁ e *rfb*₀₁₁₃.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do fragmento (pb)
O113 F	AGCGTTTCTGACATATGGAGTG	<i>rfb</i> ₀₁₁₃	593
O113 R	GTGTTAGTATCAAAAGAGGCTCC	<i>rfb</i> ₀₁₁₃	
O157 F	CGGACATCCATGTGATATGG	<i>rfb</i> ₀₁₅₇	259
O157 R	TTGCTATGTACAGCTAATCC	<i>rfb</i> ₀₁₅₇	
O111 F	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC	<i>rfb</i> ₀₁₁₁	406
O111 R	ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC	<i>rfb</i> ₀₁₁₁	

3.4.4 Amplificação simultânea dos genes da região LEE e suas variantes

As amostras *eae*⁺ (n=109) foram submetidas à reações de amplificação para a detecção das variantes genéticas da região LEE: *eae* α , *eae* β , *eae* γ , *tir* α , *tir* β , *tir* γ , *espA* α , *espA* β , *espA* γ , *espB* α , *espB* β , *espB* γ foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por China e colaboradores (1999).⁸⁹ Após a extração do DNA por lise térmica, uma alíquota de 5µl de DNA foi acrescentada a uma mistura contendo: 2 mM dNTP, tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 40 mM de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase para um volume final de 50 µl. Para *espA*, os seguintes ciclos foram realizados: 1 X 94°C por 5 min e 30 X (94°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 30 s). Para *espB*, *eae* e *tir*, os seguintes ciclos foram realizados: 94°C por 5 min e 30 X (94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 30s). Como controles de reação foram utilizadas as cepas E2348 (*eae* α ⁺ *tir* α ⁺ *espA* α ⁺ *espB* α ⁺), B171 (*eae* β ⁺ *tir* β ⁺ *espA* β ⁺ *espB* β ⁺) e RJ581 (*eae* γ ⁺ *tir* γ ⁺ *espA* γ ⁺ *espB* γ ⁺). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados encontram-se no quadro 9.

Quadro 9. Iniciadores utilizados para amplificação simultânea dos genes *eae α* , *eae β* , *eae γ* , *tira α* , *tir β* , *tir γ* , *espA α* , *espA β* , *espA γ* , *espB α* , *espB β* e *espB γ* .

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do fragmento (pb)
B73	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	<i>eaeα</i>	452
B138	GACCAGAAGAAGATCCA	<i>eaeα</i>	
B73	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	<i>eaeβ</i>	520
B137	TGTATGTCGCACTCTGATT	<i>eaeβ</i>	
B73	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	<i>eaeγ</i>	778
B74	AGGAAGAGGGTTTTGTGTT	<i>eaeγ</i>	
B139	CRCKCCAYTACCTTCACA	<i>tira</i>	342
B152	CGCTAACCTCCAAACCATT	<i>tira</i>	
B139	CRCKCCAYTACCTTCACA	<i>tirβ</i>	560
B140	GATTTTTCCCTCGCCACTA	<i>tirβ</i>	
B139	CRCKCCAYTACCTTCACA	<i>tirγ</i>	781
B141	GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC	<i>tirγ</i>	
B163	TGAGGCATCTAARGMGTC	<i>espAα</i>	269
B165	GCTGGCTATTATTGACCG	<i>espAα</i>	
B163	TGAGGCATCTAARGMGTC	<i>espAβ</i>	101
B166	TGCCTTTCTTATTCTTGTC	<i>espAβ</i>	
B163	TGAGGCATCTAARGMGTC	<i>espAγ</i>	172
B164	ATCACGAATACCAGTTACCA	<i>espAγ</i>	
B148	GCCGTTTTTGAGAGCCA	<i>espBα</i>	94
B151	TCCCCAGGACAGATGAGAT	<i>espBα</i>	
B148	GCCGTTTTTGAGAGCCA	<i>espBβ</i>	233
B149	CTTCCGTTGCCTTAGT	<i>espBβ</i>	
B148	GCCGTTTTTGAGAGCCA	<i>espBγ</i>	188
B150	GCACCAGCAGCCTTTGA	<i>espBγ</i>	

Legenda. R= A+G, K= T+G, Y= C+T, M= A+C.

3.4.5 Amplificação simultânea dos genes *fliC_{h7}* e *rfbE*

As amostras bacterianas *rfb_{O157+}* (n=156) foram submetidas às reações de amplificação para a detecção dos genes *rfbE* e *fliC_{h7}* segundo recomendações de Gordillo e colaboradores (2011).⁹⁰ A reação foi realizada utilizando-se uma mistura contendo uma alíquota de 3 μ L de DNA, 0,2 mM dNTP, tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.8), 40 mM de cada primer, 6U de Taq DNA polimerase para um volume final de 50 μ L. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf®) e submetida a um ciclo de desnaturação inicial à 95° por 2,5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° por 30 s, 58° por 1 min e 72° por 1

min, com uma extensão final de 72° por 5 min. Como controle de reação foi utilizada a cepa ATCC E30138 (*rfbE*+ *fliC_{h7}*+). As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se no quadro 10.

Quadro 10: Iniciadores utilizados para amplificação simultânea dos genes *fliC_{h7}* e *rfbE*.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do fragmento (pb)
RFBEO157 F	GGATGACAAATATCTGCGCTGC	<i>rfbE</i>	213
RFBEO157 R	GGTGATTCCCTTAATTCCTCTCTTTCC	<i>rfbE</i>	
FLICH7 F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	<i>fliC_{h7}</i>	625
FLICH7 R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	<i>fliC_{h7}</i>	

3.4.6 Amplificação Randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR)

A reação de RAPD-PCR foi realizada para todas as amostras STEC (n=167) seguindo a metodologia proposta por Pacheco e colaboradores (1997).⁶⁷ O DNA bacteriano foi obtido por lise térmica a partir de uma suspensão bacteriana de concentração definida. Para a reação de PCR foi utilizado um volume final de 30µL contendo 2µL do DNA bacteriano, 3µL de tampão 10X (Invitrogen[®]), 30pmol/µL de cada iniciador, 250µM de cada dNTP (Invitrogen[®]), 3mM de MgCl₂ (Invitrogen[®]) e 1U/µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]). A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf[®]) e programada uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto seguida de 4 ciclos de 94°C por 4 minutos, 37°C por 4 minutos e 72°C por 4 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 37°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 10 minutos. Para a reação foram utilizados os iniciadores 1254, 1290 e A04 (Quadro 11).

Quadro 11. Iniciadores para amplificação randômica do DNA polimórfico.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Concentração do primer (pmol/µL)
1254	CCGCAGCCAA	30
1290	GTGGATGCGA	30
A04	AATCGGGCTG	30

3.4.7 Amplificação simultânea para o agrupamento filogenético das amostras de *E. coli* carreadoras dos genes *stx*

A detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TspE4.C2 foi realizada para as amostras STEC (n=167) através de ensaios de amplificação segundo recomendações de Clermont e colaboradores (2000).⁶⁹ Para a reação de PCR foi utilizado um volume final de 20µL contendo 3µL do DNA bacteriano, 2µL de tampão 10X (Invitrogen[®]), 20pmol/µL de cada iniciador, 0,16mM de dNTP (Invitrogen[®]), 3mM de MgCl₂ (Invitrogen[®]) e 2,5U/µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]). A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf[®]) e programada para desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos seguida de 30 ciclos de 94°C por 5 segundos e 59°C por 10 segundos seguida de uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Como controle de reação foi utilizado a amostra selvagem 46III (*chuA*+, *yjaA*+ e TspE4.C2+). As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se no quadro 12.

Quadro 12. Iniciadores de PCR-triplex para agrupamento filogenético de STEC.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do fragmento (pb)
chuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<i>chuA</i>	279
chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
yjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	<i>yjaA</i>	211
yjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	TspE4.C2	152
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

3.4.8 Detecção dos produtos de PCR

Ao final da reação, aproximadamente 12µL dos produtos resultantes de amplificação foram adicionados a 2µL de tampão de corrida (*gel loading buffer* - Invitrogen[®]), 6µl GelRed Nucleic Acid Stain (Uniscience) e submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 2% (p/v) (PCR - *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehxA*), 1% (p/v) (PCR - *rfb*₀₁₅₇, *rfb*₀₁₁₁ e *rfb*₀₁₁₃); 2% (p/v) (PCR - *eae*α, *eae*β, *eae*γ, *tir*α, *tir*β, *tir*γ, *esp*α, *esp*β, *esp*γ, *esp*β, *esp*β, *esp*β); 1% (p/v) (PCR - *rfb*₀₁₅₇ e *fliC*_{h7}); 1,5%

(p/v) (PCR-RAPD) e 1,2% (p/v) (PCR- *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2), preparado em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X. O gel foi inspecionado visualmente em transiluminador de luz ultravioleta (UVITec[®], Cambridge, Reino Unido) e fotografados em sistema de captura de imagem digital (UVIPro silver[®], Cambridge, Reino Unido). Para estimar o tamanho dos fragmentos obtidos foi utilizado o padrão de 100pb DNA ladder (Invitrogen[®]) (PCR.- *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehxA*/ *rfb*₀₁₅₇, *rfb*₀₁₁₁ e *rfb*₀₁₁₃/ *eae* α , *eae* β , *eae* γ , *tir* α , *tir* β , *tir* γ , *espA* α , *espA* β , *espA* γ , *espB* α , *espB* β , *espB* γ / *rfb*₀₁₅₇ e *fliC*_{h7}/ *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2) e 1Kb DNA ladder (Invitrogen[®]) (PCR-RAPD). A reprodutibilidade dos perfis foi avaliada observando-se a repetição do padrão eletroforético com base em diferentes reações de amplificação e de culturas do mesmo isolado. O critério para definição dos perfis eletroforéticos foi baseado na presença e ausência de bandas. Os perfis foram submetidos às análises visual e computadorizada utilizando o sistema UVITEC-UVIPRO, programa UVIbandmap, versão 11.9.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Bioquímica

Das 301 amostras de *E. coli* coletadas, 73,4% (221/301) eram móveis e 26,6% (80/301) imóveis, 56,5% (170/301) foram produtoras de gás e 43,5% (131/301) não produziram gás. Com relação ao sorbitol, 62,5% (188/301) das amostras fermentaram o sorbitol (sorbitol+) e 37,5% (113/301) não fermentaram (sorbitol-).

4.1.1 Análise bioquímica por estado

No Rio de Janeiro, das 136 amostras de *E. coli* coletadas, 70,6% (96/136) eram móveis e 29,4% (40/136) imóveis, 74,3% (101/136) foram produtoras de gás e 25,7% (35/136) não produziram gás. Com relação ao sorbitol, 67,6% (92/136) das amostras fermentaram o sorbitol (sorbitol+) e 32,4% (44/136) não fermentaram (sorbitol-).

Em Rondônia, das 165 amostras de *E. coli* coletadas, 75,8% (125/165) eram móveis e 24,2% (40/165) imóveis, 41,8% (69/165) foram produtoras de gás e 58,2% (96/165) não produziram gás. Com relação ao sorbitol, 58,2% (96/165) das amostras fermentaram o sorbitol (sorbitol+) e 41,8% (69/165) não fermentaram (sorbitol-).

4.2 PCR para detecção dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehxA*

4.2.1 Diagnóstico molecular de STEC

Das 301 amostras incluídas neste estudo, 167 (55,5%) foram consideradas STEC por serem carreadoras de, pelo menos, um dos marcadores característicos do patotipo: genes *stx*₁ e/ou *stx*₂ (Figura 1). Dessas 167 amostras 2,4% (4/167) foram carreadoras de *stx*₁+, 12% (20/167) de *stx*₂+ e 85,6% (143/167) de ambos os genes *stx*₁ e *stx*₂ (Tabela 1).

4.2.1.1 Diagnóstico molecular de STEC por estado

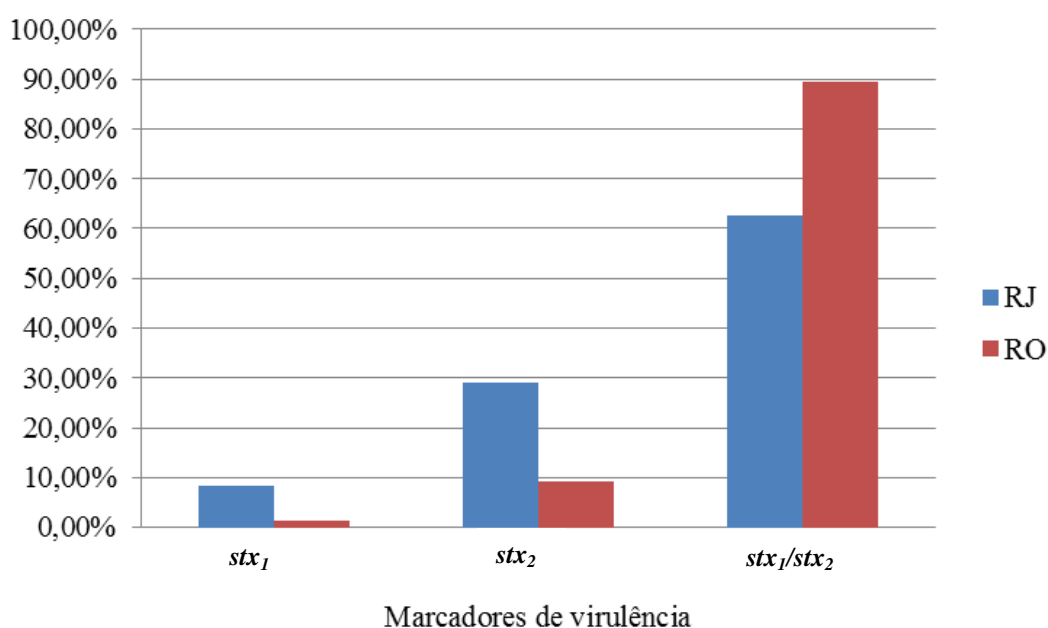
Das 167 amostras de STEC detectadas, 24 foram isoladas do estado do Rio de Janeiro, representando 14,4% (24/167) e 143 do estado de Rondônia, representando 85,6% (143/167) do total de amostras de STEC.

No estado do Rio de Janeiro, 8,3% das amostras (2/24) foram carreadoras do gene *stx*₁, 29,2% (7/24) do gene *stx*₂₊ e 62,5% de ambos os genes *stx*₁ e *stx*₂ (Tabela 1 e gráfico 1). Dos 20 bovinos provenientes desse estado, 45% (9/20), com idade variando de 1 mês a 8 anos, apresentaram amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx*, sendo que 55,56% (5/9) desses animais, com 2 meses a 8 anos de idade, apresentaram somente amostras *stx*₁₊ e *stx*₂₊. Os bovinos B004, de 4 anos (Guapimirim) e B019, de 2 meses (Cachoeira de Macacu) apresentaram somente amostras *stx*₂₊; o B009, de 1 mês (Guapimirim) apresentou seis amostras *stx*₁₊ e *stx*₂₊ e uma amostra somente *stx*₂₊; e o bovino B020, de 2 meses (Cachoeira de Macacu) apresentou uma amostra *stx*₁₊ e *stx*₂₊, duas amostras somente *stx*₁₊ e 2 amostras somente *stx*₂₊. Nenhum dos bovinos que possuíram amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx* apresentavam enteropatias. Todas as propriedades apresentavam sala de ordenha e somente a propriedade Jororó do Sertão, localizada em Cachoeira de Macacu, fazia ordenha manualmente.

No estado de Rondônia, 1,4% (2/143) dos isolados foram *stx*₁₊, 9,1% (13/143) *stx*₂₊ e 89,5% (128/143) *stx*₁₊ e *stx*₂₊ (Tabela 1 e gráfico 1). Dos 38 bovinos provenientes desse estado, 92,1% (35/38), com idade variando de 4 a 15 anos, apresentaram amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx*, sendo que 88,6% (31/35) desses animais, com 5-15 anos de idade, apresentaram somente amostras *stx*₁₊ e *stx*₂₊. O bovino B033, de 6 anos (Corumbiaria), apresentou uma amostra *stx*₁₊ e *stx*₂₊, uma amostra somente *stx*₁₊ e três amostras somente *stx*₂₊; o bovino B036 (Cacoal), de 4 anos, apresentou três amostras somente *stx*₂₊ e duas amostras *stx*₁₊ e *stx*₂₊; o bovino B040 (Cacoal), de 7 anos, quatro amostras *stx*₁₊ e *stx*₂₊ e uma amostra somente *stx*₂₊; e o bovino B047 (Ji-Paraná), de 7 anos, a presentou duas amostras somente *stx*₂₊ e duas amostras *stx*₁₊ e *stx*₂₊. Nenhum dos animais que possuíram amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx* apresentavam enteropatias. Todas as propriedades apresentavam sala de ordenha e em todas as propriedades a ordenha era feita de forma manual.

Tabela 1. Prevalência de STEC nos estados de Rio de Janeiro e Rondônia.

Estado	Marcadores STEC (%)		
	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂
RJ (n=24)	8,3% (2/24)	29,2% (7/24)	62,5% (15/24)
RO (n=143)	1,4% (2/143)	9,1% (13/143)	89,5% (128/143)
Total (n=167)	2,4% (4/167)	12% (20/167)	85,6% (143/167)

**Gráfico 1. Proporção dos genes *stx* nas amostras de STEC por estado.**

4.2.2 Prevalência de genes relacionados à virulência (*eae* e *ehxA*)

Das 301 amostras de *E. coli* incluídas no estudo, 36,2% (109/301) foram *eae*⁺ (Figura 1), sendo que dessas, 94,5% (103/109) eram *stx*₁⁺ e/ou *stx*₂⁺.

Com relação à enterohemolisina (Figura 1), 21,3% (64/301) das amostras foram carreadoras do gene *ehxA*. Dentre essas, 87,5% (56/64) eram também carreadoras dos genes *stx*₁ e/ou *stx*₂.

4.2.2.1 Prevalência de genes relacionados à virulência (*eae* e *ehxA*) por estado

No estado do Rio de Janeiro as amostras *eae*⁺ corresponderam a 17% (23/136) do total de amostras (n=136) provenientes deste local. Já as amostras *ehxA*⁺ corresponderam a 14% (19/136) das amostras. Dentre as amostras carreadoras dos genes *stx* (n=24), 75% (18/24) eram *eae*⁺ e 50% (12/24) eram *ehxA*⁺ (Tabela 2).

Com relação ao estado de Rondônia (n=165), 52,1% (86/165) foram *eae*⁺ e 27,3% (45/165) *ehxA*⁺. Dentre as amostras carreadoras dos genes *stx* (n=143), 59,4% (85/143) eram *eae*⁺ e 30,8% (44/143) eram *ehxA*⁺. Somente uma amostra foi *eae*⁺ e *ehxA*⁺ sem ser carreadora de nenhum dos genes *stx*.

Tabela 2. Prevalência dos genes *eae* e *ehxA* em amostras STEC por estado.

Estado	Marcadores de Virulência em STEC (%)	
	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>
RJ (n=24)	75% (18/24)	50% (12/24)
RO (n=143)	59,4% (85/143)	30,8% (44/143)
Total (n=167)	61,7% (103/167)	39,2% (56/167)

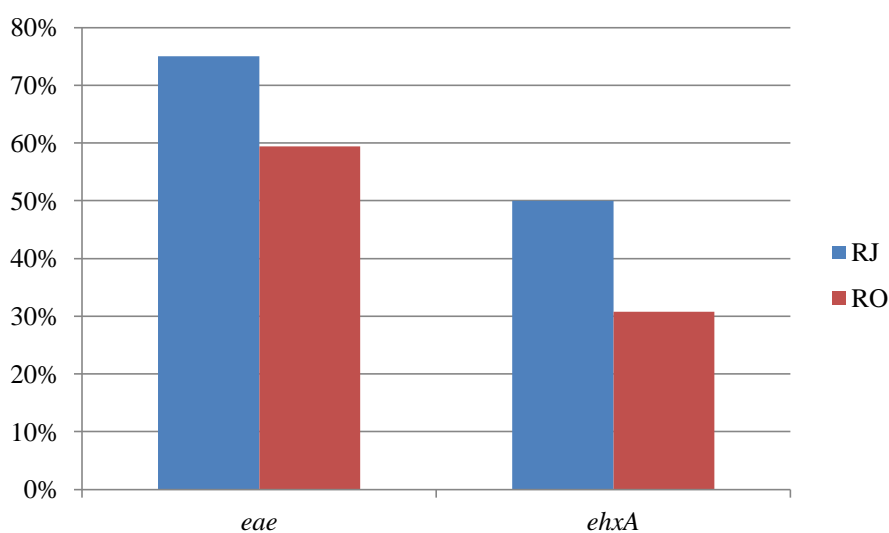


Gráfico 2. Proporção de amostras STEC carreadoras dos genes *eae* e *ehxA* por estado.

4.2.3 Perfis genéticos de virulência

Com base nos marcadores investigados, foram detectados 11 perfis genéticos de STEC (*stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂/*eae*, *stx*₁/*stx*₂/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂, *stx*₁/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*ehxA*, *stx*₁, *stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₂/*eae*, *stx*₂/*ehxA* e *stx*₂) e dois perfis não-STECS, (*eae*/*ehxA* e *ehxA*).

Entre as amostras STEC (n=167), os perfis mais frequentes foram: 25,1% (42/167) *stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, 27% (45/167) *stx*₁/*stx*₂/*eae*, 2,4% (4/167) *stx*₁/*stx*₂/*ehxA*, 31,1% (52/167) *stx*₁/*stx*₂, 1,2% (2/167) *stx*₁/*eae*/*ehxA*, 0,6% (1/167) *stx*₁/*ehxA*, 0,6% (1/167) *stx*₁, 3% (5/167) *stx*₂/*eae*/*ehxA*, 4,8% (8/167) *stx*₂/*eae*, 1,2% (2/167) *stx*₂/*ehxA* e 3% (5/167) *stx*₂. Entre as amostras de *E. coli* não STEC (n=134) o perfil *eae*/*ehxA* correspondeu a 4,5% (6/134) e o perfil *ehxA* a 1,5% (2/134) do total.

Do total de 301 amostras de *E. coli*, 41,9% (126/301) não foram carreadoras dos genes pesquisados.

4.2.3.1 Perfis genéticos de virulência por estado

No grupo de amostras do estado do Rio de Janeiro foram encontrados oito perfis genéticos correspondentes a *E. coli* produtora de toxina Shiga (*stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂/*eae*, *stx*₁/*stx*₂, *stx*₁/*eae*/*ehxA*, *stx*₁, *stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₂/*eae* e *stx*₂) e dois perfis não-STECS (*eae*/*ehxA* e *ehxA*). Com relação às amostras carreadoras do gene *stx* (n=24): 41,6% (10/24) apresentaram o perfil *stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, 12,5% (3/24) *stx*₁/*stx*₂/*eae*, 8,3% (2/24) *stx*₁/*stx*₂, 4,2% (1/24) *stx*₁/*eae*/*ehxA*, 4,2% (1/24) *stx*₁, 4,2% (1/24) *stx*₂/*eae*/*ehxA*, 8,3% (2/24) *stx*₂/*eae* e 16,7% (4/24) o perfil *stx*₂ (Tabela 3). Os perfis não STECS *eae*/*ehxA* e *ehxA* corresponderam a 4,5% (5/112) e a 1,8% (2/112), respectivamente, das amostras de *E. coli* que não eram carreadoras de nenhum gene *stx*.

Já as amostras do estado de Rondônia apresentaram 10 perfis de STECS (*stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂/*eae*, *stx*₁/*stx*₂/*ehxA*, *stx*₁/*stx*₂, *stx*₁/*eae*/*ehxA*, *stx*₁/*ehxA*, *stx*₂/*eae*/*ehxA*, *stx*₂/*eae*, *stx*₂/*ehxA* e *stx*₂) e um perfil não-STECS (*eae*/*ehxA*). Dentre as amostras carreadoras dos genes *stx* (n=143): 22,4% (32/143) apresentaram o perfil *stx*₁/*stx*₂/*eae*/*ehxA*, 29,4% (42/143) *stx*₁/*stx*₂/*eae*, 2,8% (4/143) *stx*₁/*stx*₂/*ehxA*, 34,9% (50/143) *stx*₁/*stx*₂, 0,7% (1/143) *stx*₁/*eae*/*ehxA*, 0,7% (1/143) *stx*₁/*ehxA*, 2,8% (4/143) *stx*₂/*eae*/*ehxA*, 4,2% (6/143) *stx*₂/*eae*, 1,4% (2/143) *stx*₂/*ehxA* e 0,7% (1/143) *stx*₂

(Tabela 3). O perfil não-STECC *eae/ehxA*, correspondeu a 4,5% (1/22) das amostras de *E. coli* que não foram carreadoras de nenhum dos genes *stx* (n=22).

Tabela 3. Prevalência dos perfis genéticos detectados entre as amostras de STECC isoladas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.

Perfis genéticos de virulência em STECC	% RJ (n=24)	% RO (n=143)	% Total (n=167)
<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ / <i>eae/ehxA</i>	41,6% (10/24)	22,4% (32/143)	25,1% (42/167)
<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i>	12,5% (3/24)	29,4% (42/143)	27% (45/167)
<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ / <i>ehxA</i>	-	2,8% (4/143)	2,4% (4/167)
<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂	8,3% (2/24)	34,9% (50/143)	31,1% (52/167)
<i>stx</i> ₁ / <i>eae/ehxA</i>	4,2% (1/24)	0,7% (1/143)	1,2% (2/167)
<i>stx</i> ₁ / <i>eae</i>	-	-	-
<i>stx</i> ₁ / <i>ehxA</i>	-	0,7% (1/143)	0,6% (1/167)
<i>stx</i> ₁	4,2% (1/24)	-	0,6% (1/167)
<i>stx</i> ₂ / <i>eae/ehxA</i>	4,2% (1/24)	2,8% (4/143)	3% (5/167)
<i>stx</i> ₂ / <i>eae</i>	8,3% (2/24)	4,2% (6/143)	4,8% (8/167)
<i>stx</i> ₂ / <i>ehxA</i>	-	1,4% (2/143)	1,2% (2/167)
<i>stx</i> ₂	16,7% (4/24)	0,7% (1/143)	3% (5/167)

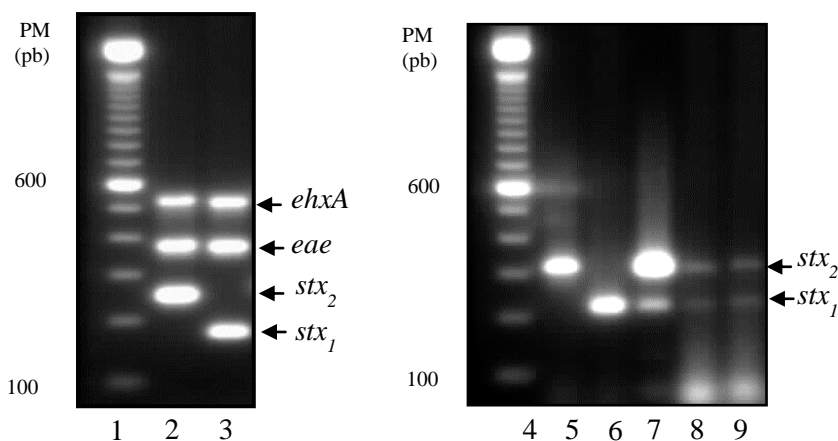


Figura 1. Perfis eletroforéticos dos marcadores genéticos genes associados ao patótipo STEC. Colunas: (1) padrão de peso molecular 100pb; (2) ATCC E30138 ; (3) ATCC E40705; (4) padrão de peso molecular 100pb; (5) BSP 019 II; (6) BSN O20 V; (7) BSP 025 I; (8) BSP 026 II; (9) BSP 026 II.

4.3 PCR-sorogrupagem (*rfb₀₁₅₇*, *rfb₀₁₁₁* e *rfb₀₁₁₃*)

Do total das 167 amostras STEC, 3,6% (6/167) foram caracterizadas genotipicamente como pertencentes ao sorogrupo O113 e 93,4% (156/167) como pertencentes ao sorogrupo O157. Não foram detectadas amostras carreadoras do gene *rfb₀₁₁₁*, que caracterizaria a amostra como pertencente ao sorogrupo O111 (Tabela 4). Cerca de 3% (5/167) das amostras não foram positivas para os genes pesquisados.

4.3.1 PCR-sorogrupagem por estado

Dentre das amostras isoladas no Rio de Janeiro, 100% (24/24) foram carreadoras do gene *rfb₀₁₅₇* (Figura 2), caracterizando-as como pertencentes ao sorogrupo O157 (Tabela 4).

Com relação às amostras obtidas de Rondônia, 4,2% (6/143) foram *rfb₀₁₁₃*+ (Figura 2), sendo caracterizadas como pertencentes ao sorogrupo O113 e 92,3% (132/143) apresentaram o gene *rfb₀₁₅₇*, sendo consideradas pertencentes ao sorogrupo O157 (Tabela 4). Cinco amostras (3,5%) de RO não apresentaram positividade para nenhum dos genes pesquisados.

Tabela 4. Prevalência das amostras STEC carreadoras dos genes *rfb*₀₁₅₇, *rfb*₀₁₁₁ e *rfb*₀₁₁₃ nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.

Estados (n° amostras)	<i>rfb</i> ₀₁₁₁	<i>rfb</i> ₀₁₁₃	<i>rfb</i> ₀₁₅₇
RJ (n=24)	-	-	100% (24/24)
RO (n=143)	-	4,2% (6/143)	92,3% (132/143)
Total (n=167)	-	3,6% (6/167)	93,4% (156/167)

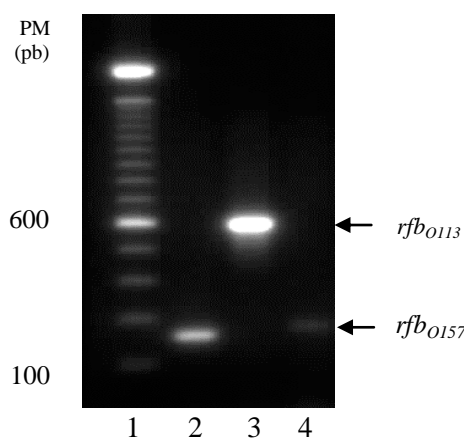


Figura 2. Perfis eletroforéticos de amostras STEC carreadoras dos genes *rfb*₀₁₅₇ e *rfb*₀₁₁₃. Colunas: (1) padrão de peso molecular 100pb; (2) BSP 10 IV; (3) BSP 026 I; (4) BSP031 I.

4.4 PCR-sorotipagem para detecção do sorotipo O157:H7

Do total de 156 amostras caracterizadas genotipicamente como pertencentes ao sorogrupo O157, 64,1% (100/156) também foram carreadoras do gene *fliC_{h7}*, sendo que dessas 100, 36% (36/100) são sorbitol- e 75% (75/100) móveis. 35,9% (56/156) foram carreadoras somente do gene *rfbE/rfb*₀₁₅₇ (Tabela 5). Dessas 56 amostras que foram somente *rfbE*⁺/*rfb*₀₁₅₇⁺, 50% (28/56) são sorbitol+ e 21,4% (12/56) imóveis.

4.4.1 PCR-sorotipagem por estado

Das 24 amostras *rfbE*⁺ detectadas no estado do Rio de Janeiro, 75% (18/24) foram *rfbE*⁺ e *fliC_{h7}*⁺, sendo que dessas 18, 11,1% (2/18) são sorbitol- e 77,87% são móveis. 25% (6/24) das amostras foram somente *rfbE*⁺ (Tabela 5). Das 6 amostras somente *rfbE*⁺, 50% (3/6) são sorbitol+ e 33,3% (2/6) imóveis.

Dentre as amostras do estado de Rondônia, 62,1% (82/132) foram *rfbE+* *flic_{h7}+*, sendo que dessas 82, 41,5% (34/82) são sorbitol- e 74,4% (61/82) imóveis. 37,9% (50/132) das amostras foram somente *rfbE+* (Tabela 5). Das 50 amostras apenas *rfbE+*, 50% (25/50) são sorbitol+ e 20% (10/50) imóveis.

Tabela 5. Prevalência das amostras STEC *rfbE+*, *flic_{h7}+* e *rfbE+*, por estado.

Estados (n° amostras)	<i>rfbE+</i> <i>flic_{h7}+</i>	<i>rfbE+</i>
RJ (n=24)	75% (18/24)	25% (6/24)
RO (n=132)	62,1% (82/132)	37,9% (50/132)
Total (n=156)	64,1% (100/156)	35,9% (56/156)

4.5 Tipagem da região LEE (*Locus of enterocyte effacement*)

As 109 amostras *eae+* (103 *stx+* e 6 *stx-*) submetidas à tipagem da região LEE para detecção de variáveis genéticas apresentaram os seguintes subtipos: *eaeα* (3/109), *eaeβ* (6/109), *eaeγ* (4/109), *tira* (2/109), *tirβ* (3/109), *tirγ* (3/109), *espAα* (3/109), *espAβ* (0/109), *espAγ* (0/109), *espBa* (1/109), *espBβ* (9/109) e *espBγ* (0/109).

Alelos não tipáveis foram detectados em, pelo menos, um gene de cada amostra testada. As diferentes combinações genéticas permitiram a detecção de 13 padrões nas seguintes proporções: 0,92% (1/109) *eaeγ/tirβ/espANT/espBβ*, 2,75% (3/109) *eaeα/tirNT/espANT/espBNT*, 0,92% (1/109) *eaeγ/tirNT/espAα/espBNT*, 6,42% (7/109) *eaeNT/tirNT/espANT/espBβ*, 0,92% (1/109) *eaeNT/tirNT/espANT/espBa*, 4,59% (5/109) *eaeβ/tirNT/espANT/espBNT*, 0,92% (1/109) *eaeNT/tira/espANT/espBNT*, 1,83% (2/109) *eaeNT/tirNT/espAα/espBNT*, 0,92% (1/109) *eaeγ/tira/espANT/espBNT*, 0,92% (1/109) *eaeβ/tirNT/espANT/espBβ*, 2,75% (3/109) *eaeNT/tirγ/espANT/espBNT*, 0,92% (1/109) *eaeγ/tirNT/espANT/espBNT* e 1,83% (2/109) *eaeNT/tirβ/espANT/espBNT*. 73,39% (80/109) foram *eaeNT/TirNT/EspANT/EspBNT* (NT = não tipáveis).

4.5.1 Tipagem da região LEE (*Locus of enterocyte effacement*) por estado

No estado do Rio de Janeiro foram detectados cinco perfis genéticos para a região LEE entre as 23 amostras isoladas *eae+*: 4,35% (1/23) *eaeγ/tirβ/espANT/espBβ*,

4,35% (1/23) *eaea/tirNT/espANT/espBNT*, 4,35% (1/23) *eaeγ/tirNT/espAα/espBNT*, 17,39% (4/23) *eaeNT/tirNT/espANT/espBβ* e 4,35% (1/23) *eaeNT/tirNT/espANT/espBα*. 65,21% (15/23) foram *eaeNT/tirNT/espANT/espBNT* (Tabela 6).

No estado de Rondônia foram detectados 10 perfis genéticos para a região LEE nas 86 amostras *eae+*: 2,33% (2/86) *eaea/tirNT/espANT/espBNT*, 3,49% (3/86) *eaeNT/tirNT/espANT/espBβ*, 5,81% (5/86) *eaeβ/tirNT/espANT/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaeNT/tira/espANT/espBNT*, 2,33% (2/86) *eaeNT/tirNT/espAα/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaeγ/tira/espANT/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaeβ/tirNT/espANT/espBβ*, 3,49% (3/86) *eaeNT/tirγ/espANT/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaeγ/tirNT/espANT/espBNT* e 2,33% (2/86) *eaeNT/tirβ/espANT/espBNT*. 75,58% (65/86) das amostras foram *eaeNT/tirNT/espANT/espBNT* (Tabela 6).

Tabela 6. Perfis genéticos da região LEE detectados entre as amostras de *E. coli* isoladas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.

Amostras	Perfis genéticos da região LEE				Estados	
	<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	RJ (n=23)	RO (n=86)
008 V	γ	β	NT	β	4,35% (1/23)	-
008 VI, 023 V, 026 III	α	NT	NT	NT	4,35% (1/23)	2,33% (2/86)
008 VII	γ	NT	α	NT	4,35% (1/23)	-
009 I, 009 V, 020 III, 020 VI, 026 IV, 049 III, 053 II	NT	NT	NT	β	17,39% (4/23)	3,49% (3/86)
014 V	NT	NT	NT	α	4,35% (1/23)	-
021 II, 021 VI, 042 V, 042 VI, 048 IV	β	NT	NT	NT	-	5,81% (5/86)
037 IV	NT	α	NT	NT	-	1,16% (1/86)
042 IV, 048 VI	NT	NT	α	NT	-	2,33% (2/86)
043 VI	γ	α	NT	NT	-	1,16% (1/86)
044 III	β	NT	NT	β	-	1,16% (1/86)
044 V, 049 I, 049 V	NT	γ	NT	NT	-	3,49% (3/86)
048 I	γ	NT	NT	NT	-	1,16% (1/86)
051 III, 053 III	NT	β	NT	NT	-	2,33% (2/86)

Legenda. NT (não tipável).

4.6 PCR-triplex para agrupamento filogenético

As amostras de STEC isoladas se encontram distribuídas nos quatro grupos filogenéticos: A (44,9%), B1 (47,3%), D (6,6%) e B2 (1,2%) (Tabela 7).

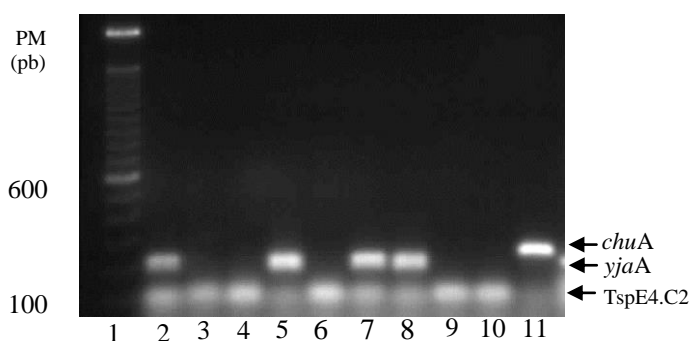


Figura 3. Perfis eletroforéticos de amostras STEC carreadoras dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TspE4.C2. Colunas: (1) padrão de peso molecular 100pb; (2) BSP 054 II (*yjaA* e TspE4.C2); (3) BSN 054 IV (TspE4.C2); (4) BSN 054 V (TspE4.C2); (5) BSP 056 III (*yjaA* e TspE4.C2); (6) BSN 056 IV (TspE4.C2); (7) BSN 056 V (*yjaA* e TspE4.C2); (8) BSN 056 VI (*yjaA* e TspE4.C2); (9) BSP 045 I (TspE4.C2); (10) BSP 045 II (TspE4.C2); (11) BSP 043 I (*chuA*).

Com base nas diferentes combinações das sequências genéticas *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2 (Figura 3), foram detectados a presença de sete perfis filogenéticos. Para o filogrupo A foram detectados os genótipos -, -, - e -, +, - representado 19,8% (33/167) e 25,1% (42/167) do total de amostras respectivamente. O filogrupo B1 teve como representantes os genótipos -, -, + e -, +, + correspondendo a 38,9% (65/167) e 8,4% (14/167) do total de amostras respectivamente. O grupo filogenético B2 apresentou somente um genótipo, +, +, - representando 1,2% (2/167) do total de amostras. Já o grupo D apresentou os genótipos +, -, - e +, -, + correspondendo a 4,8% (8/167) e 1,8% (3/167) do total de amostras respectivamente.

Tabela 7. Perfil filogenético das amostras de STEC incluídas no estudo.

(Continua)

Grupo filogenético	Perfil filogenético			Nº de amostras	(%)
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2		
A	-	-	-	33	44,9% (75/167)
	-	+	-	42	
B1	-	-	+	65	47,3% (79/167)
	-	+	+	14	
B2	+	+	+	0	1,2% (2/167)
	+	+	-	2	

Tabela 7. Perfis filogenético das amostras de STEC incluídas no estudo.

(Conclusão)

Grupo filogenético	Perfil filogenético			Nº de amostras	(%)
	chuA	yjaA	TspE4.C2		
D	+	-	-	8	6,6% (11/167)
	+	-	+	3	
Total				167	100% (167/167)

4.6.1 Filogrupagem por estado

O grupo filogenético A representou 58,3% (14/24) das amostras de STEC isoladas do estado do Rio de Janeiro, seguido dos filogrupos B1 com 25% (6/24) e dos filogrupos D e B2, ambos com 8,3% (2/24).

No estado de Rondônia prevaleceu o filogrupo B1 com 51% (73/143) das amostras de STEC, seguido dos filogrupos A representando 42,7% (61/143) e D com 6,3% (9/143).

No estado do Rio de Janeiro, o filogrupo A apresentou os genótipos -,- e -,+,- representando, respectivamente, 4,2% (1/24) e 54,2% (13/24) do total de amostras de STEC isoladas. Já para o filogrupo B1, 16,7% (4/24) das amostras apresentaram o genótipo -,-,+ e 8,3% (2/24) das amostras apresentaram o genótipo -,+,. O filogrupo D apresentou os genótipos +,-,- e +,-,+, ambos correspondendo a 4,2% (1/24) cada. O filogrupo B2 apresentou somente o genótipo +,+,- correspondendo a 8,3% (2/24) do total de amostras de STEC do estado do Rio de Janeiro (Tabela 8).

Em Rondônia o filogrupo B1 apresentou o genótipo -,-,+ em 42,7% (61/143) das amostras e o genótipo -,+,, em 8,4% (12/143) das amostras. O filogrupo A apresentou os genótipos -,-,- e -,+,- representando 22,4% (32/143) e 20,3% (29/143) respectivamente. Já para o filogrupo D, 4,2% (6/143) das amostras possuíam o genótipo +,-,- e 1,4% (2/143) o genótipo +,-,+ (Tabela 8).

Tabela 8. Perfil filogenético das amostras de STEC isoladas dos estados do Rio de Janeiro e Rondônia.

Grupo filogenético	Perfil filogenético			RJ (%)	RO (%)
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2		
A	-	-	-	4,2% (1/24)	22,4% (32/143)
	-	+	-	54,2 (13/24)	20,3% (29/143)
B1	-	-	+	16,7% (4/24)	42,7% (61/143)
	-	+	+	8,3% (2/24)	8,4% (12/143)
B2	+	+	+	-	-
	+	+	-	8,3% (2/24)	-
D	+	-	-	4,2% (1/24)	4,2% (6/143)
	+	-	+	4,2% (1/24)	1,4% (2/143)
Total				100% (24/24)	100% (143/143)

4.7 Amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR)

A análise do genoma total foi realizada empregando os iniciadores: 1290 (5'-GTGGATGCGA-3'), 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3') e A04 (5'-AATCGGGCTG-3'). As reações de amplificação empregando o iniciador 1290 geraram perfis polimórficos compostos por 1 a 9 bandas, sendo que duas amostras (BSP 049 VI e BSP 054 V) não apresentaram produtos de amplificação. Do total de 167 amostras submetidas a tipagem pelo RAPD, 134 diferentes perfis eletroforéticos estáveis e reprodutíveis foram detectados (Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13). Os ensaios realizados com os iniciadores 1254 e A04 geraram perfis polimórficos detectáveis em poucas amostras, sendo seus resultados descartados deste estudo.

A análise visual da amplificação randômica do DNA polimórfico permitiu detectar que as STEC isoladas do RJ e RO constituem uma população bacteriana geneticamente diversa (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8). Perfis idênticos foram observados entre amostras provenientes de um mesmo animal e de animais distintos, porém, pertencentes à mesma propriedade rural (Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13). Somente um perfil genético (nº42) foi igual entre dois animais provenientes de regiões geográficas distintas: o bovino nº 29 (amostras 029 I, 029 II e 029 III), pertencente à Estância Laiz localizada no município de Presidente Médice, em Rondônia e três amostras do animal nº 33 (033

II, 033 III e 033 IV), pertencente à Fazenda 7 de Setembro, localizada no município de Corumbiaria, também em Rondônia (Tabelas 10 e 13). Não houve nenhum outro perfil genético idêntico entre amostras de animais provenientes de diferentes regiões geográficas.

A análise da relação de identidade genética revelou uma população bacteriana apresentando amplo espectro de similaridade, com amostras dispostas isoladamente e em pequenos grupos clonais.

No Rio de Janeiro o índice Dice de similaridade variou de 1 a 85%, para as amostras provenientes desse estado (Figura 8).

No estado de Rondônia os índices Dice de similaridade variaram de 3 a 88% para as amostras isoladas do município de Ji-Paraná, 11 a 57% para as amostras do município de Presidente Médice, 9 a 66% para as amostras do município de Corumbiaria, e de 4 a 73% para o município de Cacoal (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Tabela 9. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do estado do Rio de Janeiro.

Municípios do estado do RJ			
Guapimirim		Cachoeira de Macacu	
Perfil	Amostras	Perfil	Amostras
1	001 II	9	010 II
2	004 IV	10	010 IV
3	008 VI	11	017 III
4	009 I	12	018 II
5	009 II, 009 V, 009 VI	13	018 III, 019 II
6	009 III	14	018 IV
7	009 IV	15	019 IV, 019 VI, 020 I
8	009 IX	16	020 II, 020 V
		17	020 III
		18	020 VI

Tabela 10. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Corumbiaria, Rondônia.

Corumbiaria-RO		
Perfi RAPD	Amostras	Propriedade
42	033 II, 033 III, 033 IV	Fazenda 7 de Setembro
43	030 I	Fazenda 7 de Setembro
44	031 I	Fazenda 7 de Setembro
45	031 II, 031 III	Fazenda 7 de Setembro
46	032 I	Fazenda 7 de Setembro
47	032 II	Fazenda 7 de Setembro
48	032 III	Fazenda 7 de Setembro
49	032 IV	Fazenda 7 de Setembro
50	032 VI	Fazenda 7 de Setembro
51	033 I	Fazenda 7 de Setembro
52	033 V	Fazenda 7 de Setembro

Tabela 11. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Ji-Paraná, Rondônia. (Continua)

Ji-Paraná-RO		
Perfil RAPD	Amostras	Propriedade
19	021 I	Fazenda Ibituruna
20	021 II	Fazenda Ibituruna
21	021 III	Fazenda Ibituruna
22	021 IV	Fazenda Ibituruna
23	023 III	Fazenda Ibituruna
24	023 IV	Fazenda Ibituruna
25	023 V, 023 VI, 024 I	Fazenda Ibituruna
26	024 II	Fazenda Ibituruna
27	024 III	Fazenda Ibituruna
28	024 IV	Fazenda Ibituruna
29	024 V	Fazenda Ibituruna
30	024 VI	Fazenda Ibituruna
31	025 II, 025 III	Fazenda Ibituruna
77	043 I	Fazenda Santa Luzia
78	043 II	Fazenda Santa Luzia
79	043 III	Fazenda Santa Luzia
80	043 IV, 043 VI	Fazenda Santa Luzia
81	043 V	Fazenda Santa Luzia

Tabela 11. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Ji-Paraná, Rondônia. (Continuação)

Perfil RAPD	Amostras	Propriedade
82	044 I	Fazenda Santa Luzia
83	044 II	Fazenda Santa Luzia
84	044 III	Fazenda Santa Luzia
85	044 IV	Fazenda Santa Luzia
86	044 V	Fazenda Santa Luzia
87	044 VI	Fazenda Santa Luzia
88	045 I	Fazenda Santa Luzia
89	045 II, 045 III, 045 VI	Fazenda Santa Luzia
90	046 I	Fazenda Santa Luzia
91	046 II	Fazenda Santa Luzia
92	046 VI	Fazenda Santa Luzia
93	047 I	Fazenda Santa Luzia
94	047 II	Fazenda Santa Luzia
95	047 III	Fazenda Santa Luzia
96	047 VI	Fazenda Santa Luzia
97	048 I, 048 III	Sítio Bela Vista
98	048 II	Sítio Bela Vista
99	048 IV	Sítio Bela Vista
100	048 V	Sítio Bela Vista
101	048 VI	Sítio Bela Vista
102	049 I	Sítio Bela Vista
103	049 III	Sítio Bela Vista
104	049 V	Sítio Bela Vista
105	050 I	Sítio Bela Vista
106	050 II, 050 III	Sítio Bela Vista
107	051 I	Sítio Bela Vista
108	051 II, 051 III	Sítio Bela Vista
109	051 IV	Sítio Bela Vista
110	052 I	Sítio Bela Vista
111	052 II	Sítio Bela Vista
112	052 III	Sítio Bela Vista
113	052 V	Sítio Bela Vista
114	053 I	Sítio Bela Vista
115	053 II	Sítio Bela Vista
116	053 III	Sítio Bela Vista
117	054 I	Sítio Bela Vista
118	054 II	Sítio Bela Vista
119	054 IV	Sítio Bela Vista

Tabela 11. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Ji-Paraná, Rondônia. (Conclusão)

Perfil RAPD	Amostras	Propriedade
120	055 I, 055 II	Sítio Bela Vista
121	056 I, 056 III, 056 V	Sítio Bela Vista
122	056 II	Sítio Bela Vista
123	056 IV	Sítio Bela Vista
124	056 VI	Sítio Bela Vista
125	057 I	Sítio Bela Vista
126	057 II	Sítio Bela Vista
127	057 III	Sítio Bela Vista
128	057 IV	Sítio Bela Vista
129	057 V	Sítio Bela Vista
130	057 VI	Sítio Bela Vista
131	058 IV	Sítio Bela Vista
132	058 V	Sítio Bela Vista
133	058 VI	Sítio Bela Vista
134	058 VII	Sítio Bela Vista

Tabela 12. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Cacoal, Rondônia. (Continua)

Cacoal-RO		
Perfil RAPD	Amostras	Propriedade
53	035 I	Estância Icaraíma
54	035 II	Estância Icaraíma
55	035 III	Estância Icaraíma
56	035 IV	Estância Icaraíma
57	035 V	Estância Icaraíma
58	035 VI	Estância Icaraíma
59	036 I	Estância Icaraíma
60	036 II	Estância Icaraíma
61	036 IV	Estância Icaraíma
62	036 V	Estância Icaraíma
63	036 VI, 037 IV	Estância Icaraíma
64	038 I	Estância Icaraíma
65	038 II, 038 III	Estância Icaraíma
66	039 II	Estância Icaraíma
67	039 IV	Estância Icaraíma
68	039 V	Estância Icaraíma
69	040 I, 040 II, 040 III	Estância Icaraíma
70	040 IV	Estância Icaraíma

Tabela 12. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Cacoal, Rondônia. (Conclusão)

Perfil RAPD	Amostras	Propriedade
71	040 V	Estância Icaraíma
72	041 I	Estância Icaraíma
73	041 II, 041 IV, 041 VI, 042 IV, 042 V	Estância Icaraíma
74	041 III	Estância Icaraíma
75	041 V	Estância Icaraíma
76	042 VI	Estância Icaraíma

Tabela 13. Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras de STEC isoladas do município de Presidente Médice, Rondônia.

Presidente Médici-RO		
Perfil RAPD	Amostras	Propriedade
32	026 I	Estância Laiz
34	026 II	Estância Laiz
35	026 III	Estância Laiz
36	026 IV	Estância Laiz
37	026 VI	Estância Laiz
38	028 I	Estância Laiz
39	028 II	Estância Laiz
40	028 III	Estância Laiz
41	028 VI	Estância Laiz
42	029 I, 029 II, 029 III	Estância Laiz

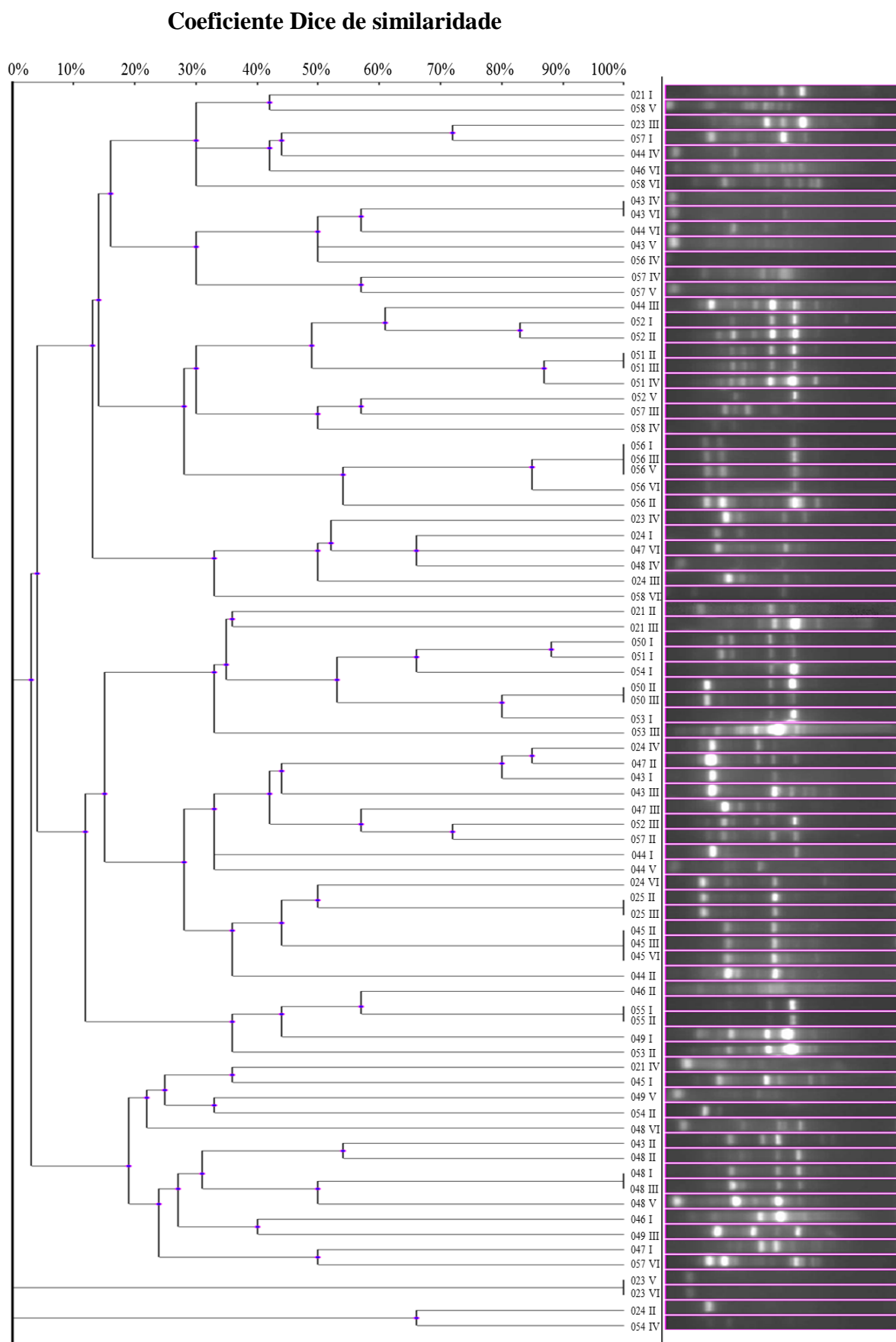


Figura 4. Dendrograma das amostras provenientes de Ji-Paraná-RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.

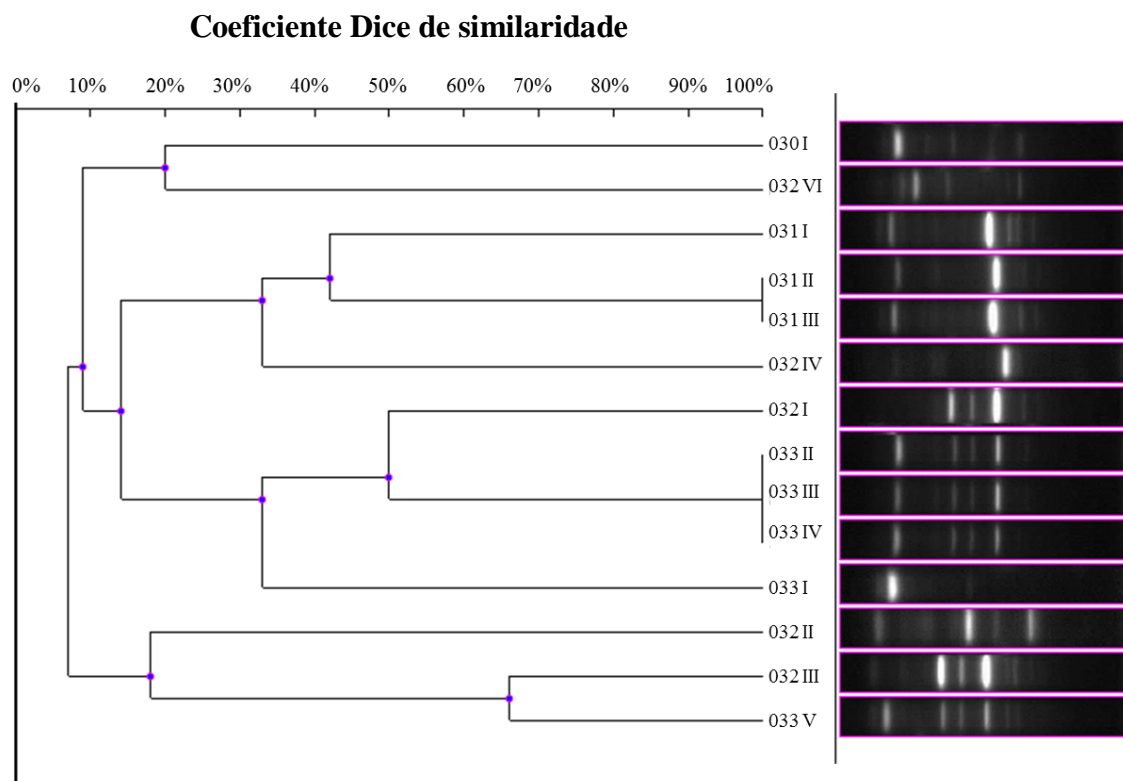


Figura 5. Dendrograma das amostras provenientes de Corumbiaria-RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.

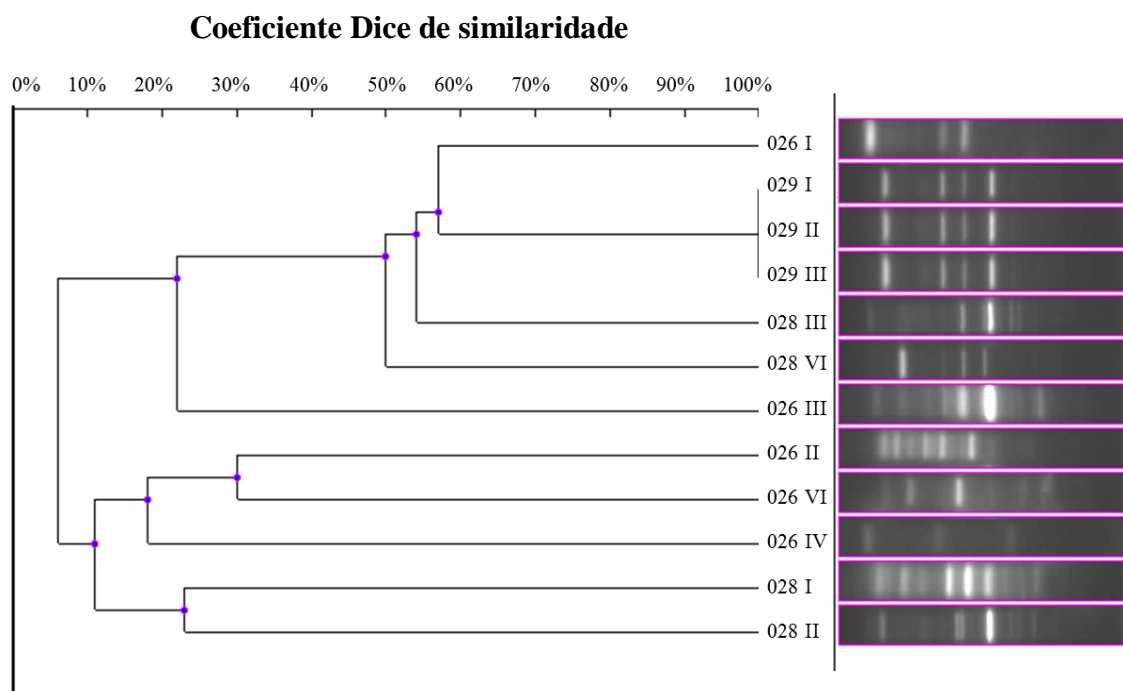


Figura 6. Dendrograma das amostras provenientes de Presidente Médice-RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador 1290.

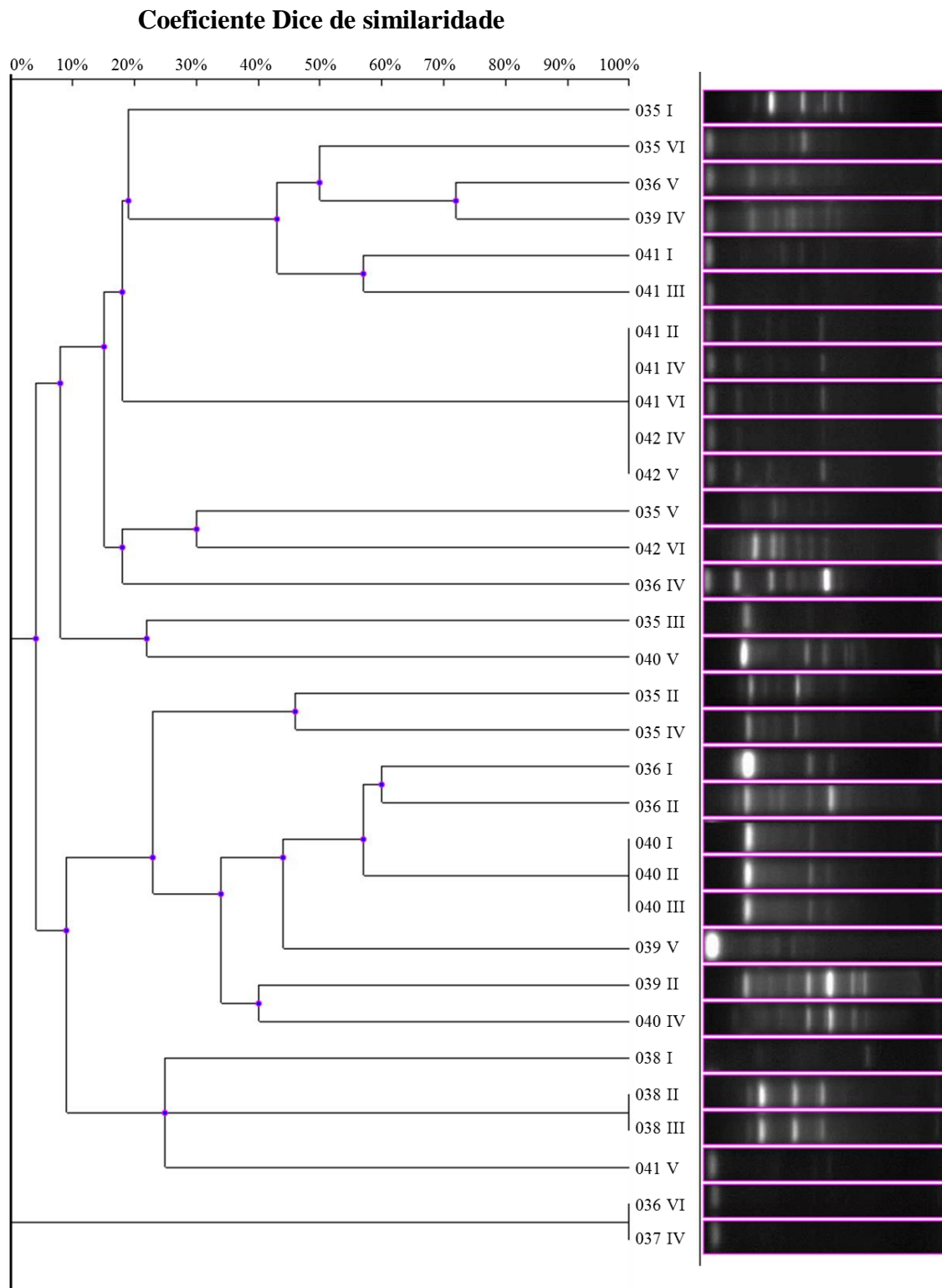


Figura 7. Dendrograma das amostras provenientes do Cacoal - RO, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.

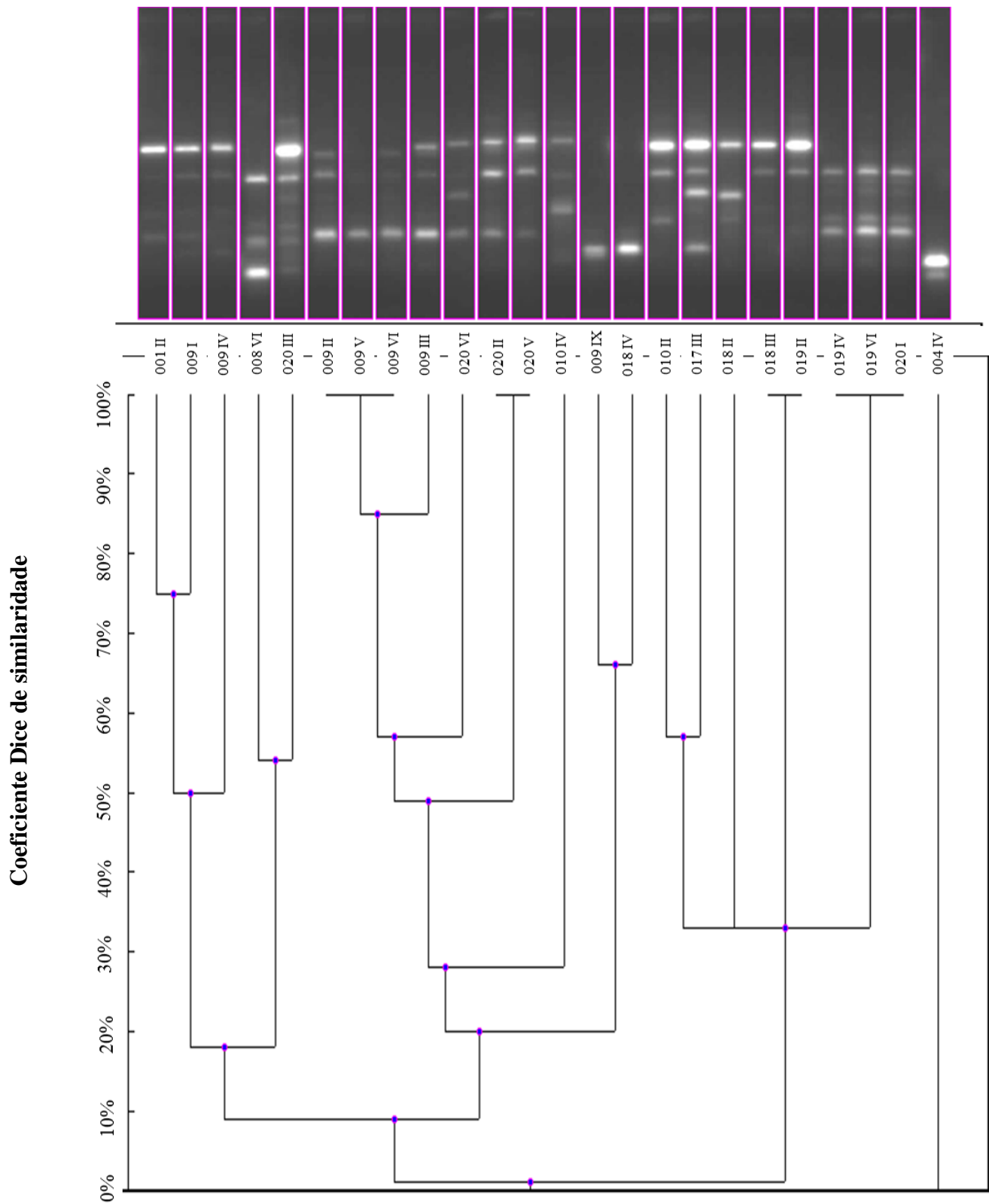


Figura 8. Dendrograma das amostras provenientes do estado do Rio de Janeiro, gerado a partir da técnica de RAPD-PCR, utilizando o iniciador 1290.

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo. (Continua)

Amostras STEC	Marcadores genéticos de virulência	Sorogrupo/ Sorotipo	Perfil RAPD	Filogrupo	Estado
BSP 001 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	1	A	RJ
BSP 004 IV	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	2	A	RJ
BSP 008 VI	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/</i>	O157:H7	3	A	RJ
BSP 009 I	<i>stx₁/stx₂/eaea/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	4	B1	RJ
BSP 009 II	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	5	B1	RJ
BSP 009 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	6	D	RJ
BSP 009 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	7	A	RJ
BSP 009 V	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	5	D	RJ
BSP 009 VI	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	5	B2	RJ
BSN 009 IX	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	8	A	RJ
BSP 010 II	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	9	A	RJ
BSP 010 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	10	A	RJ
BSP 017 III	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	11	A	RJ
BSP 018 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	12	A	RJ
BSP 018 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	13	A	RJ
BSP 019 II	<i>stx₂</i>	O157	13	A	RJ
BSN 019 IV	<i>stx₂</i>	O157	15	A	RJ
BSN 019 VI	<i>stx₂</i>	O157	15	B1	RJ
BSP 020 I	<i>stx₂</i>	O157	15	B1	RJ
BSP 020 II	<i>stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	16	B1	RJ
BSP 020 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	17	B1	RJ
BSN 020 V	<i>stx₂</i>	O157	16	A	RJ
BSP 020 VI	<i>stx₁/eae/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	18	B2	RJ
BSP 021 I	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	19	B1	RO
BSP 021 II	<i>stx₁/stx₂/eaeβ/ehxA</i>	O157:H7	20	A	RO
BSP 021 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	21	A	RO
BSP 021 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	22	A	RO
BSP 023 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	23	A	RO
BSN 023 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	24	B1	RO
BSN 023 V	<i>stx₂/eaea/ehxA</i>	O157:H7	25	A	RO

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo. (Continuação)

Amostras STEC	Marcadores genéticos de virulência	Sorogrupo/ sorotipo	Perfil RAPD	Filogrupo	Estado
BSN 023 VI	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	25	A	RO
BSP 024 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	25	A	RO
BSP 024 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	26	B1	RO
BSP 024 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	27	B1	RO
BSN 024 IV	<i>stx₁/ehxA</i>	O157	28	D	RO
BSN 024 V	<i>stx₁/stx₂/ehxA</i>	O157	29	A	RO
BSN 024 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	30	B1	RO
BSP 025 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O113	31	A	RO
BSP 025 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O113	31	A	RO
BSP 026 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O113	32	B1	RO
BSP 026 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	34	A	RO
BSP 026 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O113	35	A	RO
BSN 026 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	36	D	RO
BSN 026 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	37	A	RO
BSP 028 I	<i>stx₁/stx₂/ehxA</i>	O157	38	B1	RO
BSP 028 II	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	39	A	RO
BSP 028 III	<i>stx₁/stx₂/ehxA</i>	O157	40	B1	RO
BSN 028 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	41	B1	RO
BSP 029 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	42	B1	RO
BSP 029 II	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	42	B1	RO
BSP 029 III	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	42	B1	RO
BSP 030 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	43	B1	RO
BSP 031 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	44	B1	RO
BSP 031 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	45	B1	RO
BSP 031 III	<i>stx₁/stx₂</i>	-	45	B1	RO
BSP 032 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	46	B1	RO
BSP 032 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	47	B1	RO
BSP 032 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	48	B1	RO
BSN 032 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	49	A	RO
BSN 032 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	50	D	RO

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo. (Continuação)

Amostras STEC	Marcadores genéticos de virulência	Sorogrupo/ sorotipo	Perfil RAPD	Filogrupo	Estado
BSP 033 I	<i>stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	51	B1	RO
BSP 033 II	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	42	B1	RO
BSP 033 III	<i>stx₁/eae/ehxA</i>	O157:H7	42	B1	RO
BSP 033 IV	<i>stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	42	B1	RO
BSP 033 V	<i>stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	52	B1	RO
BSP 035 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	53	B1	RO
BSP 035 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	54	A	RO
BSP 035 III	<i>stx₁/stx₂/ehxA</i>	O157	55	A	RO
BSP 035 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	56	A	RO
BSP 035 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	57	A	RO
BSN 035 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	58	A	RO
BSP 036 I	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	59	B1	RO
BSP 036 II	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	60	B1	RO
BSN 036 IV	<i>stx₂/eae</i>	O157:H7	61	B1	RO
BSN 036 V	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	62	B1	RO
BSN 036 VI	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	63	B1	RO
BSN 037 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/tira</i>	O157:H7	63	B1	RO
BSP 038 I	<i>stx₁/stx₂</i>	-	64	A	RO
BSP 038 II	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	-	65	A	RO
BSN 038 III	<i>stx₁/stx₂</i>	-	65	A	RO
BSP 039 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	66	B1	RO
BSN 039 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	67	B1	RO
BSN 039 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	68	B1	RO
BSP 040 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	69	B1	RO
BSP 040 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	69	B1	RO
BSP 040 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	69	B1	RO
BSN 040 IV	<i>stx₂</i>	O157	70	A	RO
BSN 040 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	71	A	RO
BSN 041 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	72	A	RO

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo. (Continuação)

Amostras STEC	Marcadores genéticos de virulência	Sorogrupo/ sorotipo	Perfil RAPD	Filogrupo	Estado
BSN 041 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	73	A	RO
BSN 041 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	74	A	RO
BSN 041 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	73	A	RO
BSN 041 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	75	A	RO
BSN 041 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	73	A	RO
BSN 042 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/espAα</i>	O157:H7	73	A	RO
BSN 042 V	<i>stx₁/stx₂/eaeβ</i>	O157:H7	73	A	RO
BSN 042 VI	<i>stx₁/stx₂/eaeβ</i>	O157:H7	76	A	RO
BSP 043 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	77	D	RO
BSP 043 II	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	78	A	RO
BSP 043 III	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	79	D	RO
BSN 043 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	80	A	RO
BSN 043 V	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	81	A	RO
BSN 043 VI	<i>stx₁/stx₂/eaeγ/ehxA/tira</i>	O157:H7	80	A	RO
BSN 044 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	82	A	RO
BSP 044 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	83	A	RO
BSP 044 III	<i>stx₁/stx₂/eaeβ/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	84	B1	RO
BSN 044 IV	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	85	B1	RO
BSN 044 V	<i>stx₁/stx₂/eae/tiry</i>	O157:H7	86	B1	RO
BSN 044 VI	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	87	B1	RO
BSP 045 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	88	B1	RO
BSP 045 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	89	B1	RO
BSP 045 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	89	B1	RO
BSN 045 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	89	B1	RO
BSP 046 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	90	B1	RO
BSN 046 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	91	A	RO
BSN 046 VI	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	92	A	RO
BSP 047 I	<i>stx₂/ehxA</i>	O157	93	B1	RO
BSP 047 II	<i>stx₂/ehxA</i>	O113	94	B1	RO

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo. (Continuação)

Amostras STEC	Marcadores genéticos de virulência	Sorogrupo/ sorotipo	Perfil RAPD	Filogrupo	Estado
BSP 047 III	<i>stx₁/stx₂/eaeβ/ehxA</i>	O113	95	A	RO
BSN 047 VI	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	96	A	RO
BSP 048 I	<i>stx₁/stx₂/eaeγ</i>	O157:H7	97	B1	RO
BSP 048 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	98	B1	RO
BSP 048 III	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	97	A	RO
BSN 048 IV	<i>stx₁/stx₂/eaeβ</i>	O157:H7	99	A	RO
BSN 048 V	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	100	A	RO
BSN 048 VI	<i>stx₁/stx₂/eae/espAα</i>	O157:H7	101	A	RO
BSP 049 I	<i>stx₁/stx₂/eae/tirγ</i>	O157:H7	102	A	RO
BSP 049 III	<i>stx₁/stx₂/eae/espBβ</i>	O157:H7	103	A	RO
BSN 049 V	<i>stx₁/stx₂/eae/tirγ</i>	O157:H7	104	A	RO
BSN 049 VI	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	-	A	RO
BSP 050 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	105	D	RO
BSP 050 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	106	A	RO
BSP 050 III	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	106	D	RO
BSP 051 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	107	A	RO
BSP 051 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	108	A	RO
BSP 051 III	<i>stx₁/stx₂/eae/tirβ</i>	O157:H7	108	A	RO
BSN 051 IV	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	109	B1	RO
BSP 052 I	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	110	B1	RO
BSP 052 II	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	111	B1	RO
BSP 052 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	112	B1	RO
BSN 052 V	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	113	A	RO
BSP 053 I	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	114	B1	RO
BSP 053 II	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/espBβ</i>	O157:H7	115	B1	RO
BSP 053 III	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA/tirβ</i>	O157:H7	116	A	RO
BSP 054 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	117	A	RO
BSP 054 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	118	B1	RO
BSN 054 IV	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	119	B1	RO

Tabela 14. Marcadores genéticos, sorogrupos/sorotipo, perfil RAPD e filogrupos das amostras de STEC incluídas no estudo. (Conclusão)

Amostras STEC	Marcadores genéticos de virulência	Sorogrupo/ sorotipo	Perfil RAPD	Filogrupo	Estado
BSN 054 V	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	-	B1	RO
BSP 055 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	120	B1	RO
BSP 055 II	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	120	B1	RO
BSP 056 I	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	121	B1	RO
BSP 056 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	122	B1	RO
BSP 056 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	121	B1	RO
BSN 056 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	123	B1	RO
BSN 056 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	121	B1	RO
BSN 056 VI	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	124	B1	RO
BSP 057 I	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	125	B1	RO
BSP 057 II	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	126	A	RO
BSP 057 III	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	127	B1	RO
BSN 057 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	128	B1	RO
BSN 057 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	129	B1	RO
BSN 057 VI	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	130	B1	RO
BSN 058 IV	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	131	D	RO
BSN 058 V	<i>stx₁/stx₂</i>	O157	132	B1	RO
BSN 058 VI	<i>stx₁/stx₂/eae</i>	O157:H7	133	D	RO
BSN 058 VII	<i>stx₁/stx₂/eae/ehxA</i>	O157:H7	134	A	RO

5. DISCUSSÃO

Os bovinos representam uma importante fonte de infecção de STEC, não só de maneira direta, pelo contato com esses animais, mas também indireta, através do consumo de seus produtos e derivados contaminados.^{9,10,11} Os bovinos são reconhecidos reservatórios assintomáticos de STEC, mas não é incomum bezerros apresentarem quadro clínico de diarreia seja pelas diferenças fisiológicas e imunológicas em relação aos animais adultos, ou por questões ambientais como o envolvimento do estresse no pós-desmame, permitindo que esses animais excretem nas suas fezes essa bactéria de maneira mais intensa e por um período mais longo, favorecendo a contaminação ambiental.^{2,43,44}

Não é possível erradicar as STEC do ambiente devido à colonização assintomática dos animais e da capacidade desse microrganismo de sobreviver por longos períodos nas fezes bovinas, no pasto e na água.² Entretanto, a implementação de padrões de higiene, como a presença de um ambiente limpo e calmo, propício para a ordenha dos animais, e limpeza e higienização de equipamentos e acessórios utilizados na ordenha mecanizada ou, no caso da ordenha manual, limpeza e higienização adequada das mãos do ordenhador e do úbere e tetos das vacas, é possível minimizar a carga contaminante ambiental e, conseqüentemente, obter produtos lácteos de melhor qualidade.⁸³

Este trabalho visou investigar a circulação e as características biogenéticas de amostras de *Escherichia coli* carreadoras dos genes *stx* (STEC) isoladas de amostras fecais de bovinos, pertencentes a regiões agropecuárias localizadas nos estados do Rio de Janeiro e Rondônia. Para tal foram realizados ensaios de amplificação para caracterização bacteriana quanto à presença de marcadores de virulência associados ao patotipo e para determinação de sorogrupos e sorotipos, além da avaliação da diversidade genética das amostras carreadoras dos genes *stx* e da detecção de genes específicos do agrupamento filogenético.

5.1 PCR-multiplex para diagnóstico molecular de STEC e caracterização de genes associados com virulência

Diversos estudos conduzidos no Brasil descrevem o isolamento de STEC em rebanhos leiteiros, sendo a grande maioria dessas pesquisas concentradas nas regiões sudeste e sul do país.^{41,42,91,92,93} Em um trabalho realizado no estado do Rio de Janeiro, Cerqueira e colaboradores (1999) relataram uma frequência de 82% (99/121) de STEC em amostras fecais de gado leiteiro, sendo que 58% (81/139) das amostras eram positivas para os genes *stx₁* e *stx₂* simultaneamente.⁴¹ Em São Paulo, Irino e colaboradores (2005) encontraram uma frequência de 25% de STEC em amostras fecais de bovinos leiteiros e neste estudo a maioria dos isolados também era carreadora de ambos os genes *stx₁* e *stx₂* simultaneamente (56,4%, 114/202) e de *stx₂* somente (40,6%, 82/202).⁹¹ Tristão e colaboradores encontraram positividade para o gene *stx* em 65% das amostras fecais de gado no estado do Rio de Janeiro e 28% no Rio Grande do Sul.⁴² Em um estudo realizado em Minas Gerais por Oliveira e colaboradores (2008) houve uma prevalência de 17,5% (18/103) de STEC para o gado leiteiro, sendo que a maior parte dessas STEC era carreadora apenas do gene *stx₂* (53,3%, 32/60), enquanto que 20% (12/60) carreavam ambos *stx₁* e *stx₂* e 26,7% (16/60) eram carreadoras apenas do gene *stx₁*.⁹² Vicente e colaboradores (2010) detectaram uma alta prevalência (72,16%) de sequências *stx* nas fezes de bovinos pertencentes a rebanhos leiteiros do Município de Jaboticabal-SP.⁹⁴ Os diferentes percentuais de prevalência de STEC nos estados na região sudeste, podem refletir diferenças de desenho de estudo quanto a logística de coleta e transporte de material assim como dos procedimentos e métodos laboratoriais empregados para o isolamento e detecção do patógeno.

No presente estudo foram detectadas 167 amostras carreadoras dos genes *stx* em um universo de 301 amostras-de *E. coli* isoladas (55,5%), sendo que 14,4% (24/167) das STEC eram provenientes do estado do Rio de Janeiro e 85,6% (143/167) provenientes do estado de Rondônia. As diferenças regionais observadas podem estar associadas com as questões higiênicas e a infraestrutura precária das propriedades onde viviam os animais. Nenhuma propriedade de Rondônia possuía sala de ordenha, local específico para esta atividade, que muitas vezes é realizada no próprio curral, na presença de fezes e urina dos animais, aumentando as chances de contaminação ambiental. A ordenha era feita manualmente em todas as propriedades. Já no Rio de Janeiro tanto a propriedade Fazenda Ouro Branco, localizada em Guapimirim, quanto à

propriedade Jororó do Sertão, localizada em Cachoeira de Macacu, possuíam sala de ordenha, sendo que na Fazenda Ouro Branco a ordenha era feita de forma mecanizada. O conhecimento do ordenhador sobre as técnicas de ordenha é um ponto crucial para a implantação das boas práticas de manejo. A ordenha manual em um ambiente com precárias condições de higiene e infraestrutura representa um maior risco de contágio e disseminação de microrganismos patogênicos, principalmente, em regiões de clima quente e úmido. A adoção de procedimentos básicos de higiene, antes e depois da ordenha, constitui uma das medidas preventivas em todo esse processo para minimizar o risco de contaminação.⁸³

Todos os animais dos quais foram isolados *Escherichia coli* carreadora do gene *stx* não apresentavam enteropatias, o que corrobora com estudos que afirmam que estes animais são carreadores assintomáticos de STEC.² Nos dois únicos animais que eram portadores de enteropatias, o bovino 006 (Guapimirim-RJ) e o bovino 022 (Ji-Paraná-RO), não foram isolados *Escherichia coli* carreadora do gene *stx*.

A duração e a intensidade da excreção de STEC podem variar de acordo com a idade do animal. Em um estudo feito por Cray e Moon (1995) observou-se que a excreção desse microrganismo é mais longa e intensa em bezerros do que nos animais adultos.⁴³ No nosso estudo observou-se que este padrão se confirmou nas amostras do Rio de Janeiro, onde 75% (6/8) dos bezerros, de 1-4 meses de idade, possuíam amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx* (até 7 amostras STEC+) e somente 25% (3/12) dos animais adultos, de 3-9 anos (2 animais com 4 e 5 anos em Guapimirim e um animal de 8 anos em Cachoeira de Macacu) apresentaram amostras de *E. coli* carreadoras do gene *stx* (1-2 amostras +).

No estado de Rondônia, onde todos os animais eram adultos (4-15 anos), não foi possível fazer uma comparação com resultados em bezerros, mas é importante ressaltar que neste estado houve uma grande prevalência de STEC nesses animais adultos, já que das 165 amostras de *Escherichia coli* coletadas nesse estado, 143 eram carreadoras do gene *stx* (86,67%). Não houve diferenças na quantidade de amostras positivas para as diferentes idades (1-6 amostras positivas). Os animais de até 5 anos apresentaram um média de 3,9 amostras positivas por animal, os animais de 6-10 anos, obtiveram uma média de 4,2 amostras positivas e os animais acima de 11 anos apresentaram uma média de 3,5 amostras positivas por animal.

No presente estudo, do total de 167 STEC encontradas, 85,6% (143/167) eram carreadoras dos genes *stx₁* e *stx₂* simultaneamente, seguido de 12% (20/167) carreadoras apenas de *stx₂* e 2,4% (4/167) somente de *stx₁*. Quando analisado por estado, este padrão de frequência se repetiu tanto no Rio de Janeiro, onde a maioria das amostras (62,5%, 15/24) também eram *stx₁*+ e *stx₂*+ simultaneamente, assim como em Rondônia onde 89,5% (128/143) das amostras também foram *stx₁*+ e *stx₂*+, corroborando com os estudos anteriores que evidenciaram a circulação de microrganismos com elevado potencial em causar danos severos aos seres humanos.^{41,91}

Além do marcador genético codificador da toxina Shiga, outros genes têm sido associados com uma maior ou menor virulência desses microrganismos. Apesar da presença do gene *eae* não ser necessária para causar doença severa, cepas com a combinação dos genes *stx₂/eae* são mais frequentemente isoladas de pacientes com doença severa.^{95,96} Neste estudo, do total de 301 amostras, 109 (36,2%) foram *eae*+, sendo que dessas, 94,5% (103/109) eram STEC e 5,5% (6/109) foram consideradas não-STECS por não apresentarem positividade para nenhum dos genes *stx*.

Analisando por estado, no Rio de Janeiro as amostras *eae*+ corresponderam a 17% (23/136), do total de amostras provenientes deste local. Entre as amostras STEC (n=24) 75% (18/24) eram *eae*+. Já em Rondônia, do total de 165 amostras provenientes deste local, 52,1% (86/165) foram *eae*+. Entre as amostras STEC (n=143), 59,4% (85/143) foram *eae*+

Com relação à enterohemolisina, outra importante fator associado com a virulência das STEC⁹⁷, 21,3% (64/301) do total de amostras foram *ehxA*+. Dessas 64 amostras *ehxA*+, 87,5% (56/64) eram STEC e 12,5% (8/64) não apresentaram positividade para nenhum dos genes *stx*. No estado do Rio de Janeiro, das 19 amostras *ehxA*+ detectadas, 63,2% (12/19) eram STEC e 36,8% (7/19) não apresentaram nenhum dos genes *stx*. No estado de Rondônia, do total de 165 amostras provenientes deste local, 27,3% (45/165) eram *ehxA*+ e somente uma amostra (2,2%) das 45 *ehxA*+, não possuía nenhum dos genes *stx*, mas possuía o gene *eae*, que é também um indicativo de potencial patogênico. Os resultados obtidos sugerem que as amostras de STEC de Rondônia, quando comparadas com as do Rio de Janeiro, podem carrear um potencial de virulência adicional, uma vez que os maiores percentuais para os genes *ehxA* e *eae* foram detectados entre seus isolados.

Os fatores de virulência investigados definiram 13 diferentes combinações ou perfis genéticos (Tabela 3): 11 perfis diferentes para STEC (*stx₁/stx₂/eae/ehxA*, *stx₁/stx₂/eae*, *stx₁/stx₂/ehxA*, *stx₁/stx₂*, *stx₁/eae/ehxA*, *stx₁/ehxA*, *stx₁*, *stx₂/eae/ehxA*, *stx₂/eae*, *stx₂/ehxA* e *stx₂*) e dois perfis não-STEC, (*eae/ehxA* e *ehxA*).

No Rio de Janeiro, entre os perfis mais frequentes, 2 eram STEC: *stx₁/stx₂/eae/ehxA* e *stx₂*, correspondendo a 41,7% (10/24) e 16,7% (4/24), respectivamente, das amostras carreadoras dos genes *stx*; e um perfil era não-STECC: *eae/ehxA* correspondendo a 3,7% (5/112) das amostras de *E. coli* não carreadoras de genes *stx*, provenientes desse Estado.

Em Rondônia os perfis mais frequentes foram todos STEC: *stx₁/stx₂* que correspondeu a 34,9% (50/143) das amostras carreadoras dos genes *stx*, *stx₁/stx₂/eae* que correspondeu a 29,3% (42/143) e *stx₁/stx₂/eae/ehxA* que correspondeu a 22,4% (32/143).

Esses resultados revelam uma grande diversidade no potencial de virulência desses patógenos, principalmente em Rondônia, já que até mesmo diferentes amostras de um mesmo animal possuíram perfis genéticos distintos, possivelmente conferindo uma maior ou menor capacidade desse agente em causar doenças.

5.2 PCR-multiplex para tipagem da região LEE

Neste estudo foram detectados cinco perfis genéticos para a região LEE entre as 23 amostras *eae+* do estado do Rio de Janeiro, sendo: 4,35% (1/23) *eaey/tirβ/espANT/espBβ*, 4,35% (1/23) *eaey/tirNT/espANT/espBNT*, 4,35% (1/23) *eaey/tirNT/espAa/espBNT*, 17,39% (4/23) *eaey/tirNT/espANT/espBβ* e 4,35% (1/23) *eaey/tirNT/espANT/espBa*. 65,21% (15/23) foram *eaey/tirNT/espANT/espBNT*. Já para as 86 amostras *eae+* do estado de Rondônia foram detectadas 10 perfis genéticos para a região LEE: 2,33% (2/86) *eaey/tirNT/espANT/espBNT*, 3,49% (3/86) *eaey/tirNT/espANT/espBβ*, 5,81% (5/86) *eaey/tirNT/espANT/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaey/tira/espANT/espBNT*, 2,33% (2/86) *eaey/tirNT/espAa/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaey/tira/espANT/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaey/tirNT/espANT/espBβ*, 3,49% (3/86) *eaey/tirNT/espANT/espBNT*, 1,16% (1/86) *eaey/tirNT/espANT/espBNT* e 2,33% (2/86) *eaey/tirβ/espANT/espBNT*. 75,58% (65/86) foram *eaey/tirNT/espANT/espBNT*.

Esses dados reforçam os outros resultados obtidos que revelaram uma diversidade maior entre as amostras isoladas de Rondônia quando comparadas com as do Rio de Janeiro.

O elevado percentual de amostras LEE não tipáveis sugere um possível envolvimento de outras moléculas não investigadas associadas com a virulência desses patógenos, já que somente o gene *eae* possui mais de 20 variantes e neste trabalho só foram investigadas as variantes genéticas mais frequentes. Também é possível que haja o envolvimento de moléculas ainda não descritas, o que requer o desenvolvimento de estudos mais detalhados para pesquisa e tipagem dessas moléculas, as quais podem estar envolvidas em etapas e mecanismos celulares essenciais para a expressão plena de virulência das *E. coli* produtoras de toxina Shiga.

5.3 PCR-multiplex para detecção de sorogrupos e sorotipos associados com virulência

Estudos em diversas partes do mundo têm associado a ocorrência de surtos ao sorotipo O157:H7. No Brasil a infecções causadas por STEC geralmente estão associadas com estirpes não-O157, como os sorotipos O111:NM, O111:H8, O26:H11 e O103:H2.^{7,8,98}

Nossos resultados revelaram uma alta prevalência de STEC pertencente ao sorogrupo O157, com 93,4% (156/167) do total de amostras sendo *rfb*_{O157+}, enquanto que apenas 3,6% (6/167) das amostras foram caracterizadas genotipicamente como O113. Não foram detectadas amostras O111. Em de 3% (5/167) das amostras não foi detectado produto de amplificação para os genes investigados para a sorogrupagem. Vicente e colaboradores (2010) utilizaram a mesma metodologia de nosso estudo⁸⁸ para detecção dos sorogrupos O157, O111 e O113 na cidade de Jaboticabal-SP e encontraram, respectivamente, os seguintes coeficientes de prevalência, 14,77%, 0,2% e 30,83%.

Nas amostras de STEC caracterizadas genotipicamente como pertencentes ao sorogrupo O157, 64,1% (100/156) foram *fliC*_{h7+}, sendo classificadas como pertencentes ao sorotipo O157:H7. 36% (36/100) das amostras O157:H7 foram sorbitol- e 75% (75/100) móveis, o que corresponde ao padrão desse patotipo, comumente não fermentador de sorbitol e móvel, mas cepas O157:H7 sorbitol+ e/ou imóveis já foram descritas.⁹ Das amostras O157:HNT, 21,4% (12/56) foram imóveis, o que poderia

corresponder ao antígeno H⁻, associado com cepas O157 imóveis. 78,6% (44/56) foram móveis na bioquímica, destacando a necessidade de uma investigação mais profunda acerca de diferentes antígenos H associados com *E. coli* carreadoras dos genes *stx*, além dos antígenos H7 e H⁻, comumente mais descritos para o sorogrupo. O sorogrupo O157 também tem sido associado com o antígeno H45 em amostras isoladas de gado, porém essas cepas são caracterizadas como EPEC, por não possuírem o gene *stx*.¹⁰⁰

Analisando por região geográfica, no Rio de Janeiro, 100% (24/24) das amostras foram genotipicamente caracterizadas como O157, sendo 75% (18/24) O157:H7. 11,1% (2/18) das amostras O157:H7 foram sorbitol- e 77,8% (14/18) móveis. Das amostras caracterizadas somente como O157, 33,3% (2/6) foram imóveis.

Em Rondônia, também prevaleceram as amostras *rfb*_{O157+} correspondendo a 92,3% (132/143) das STEC encontradas neste estado, enquanto que somente 4,2% (6/143) foram genotipicamente caracterizadas como O113. Das 132 amostras O157, 62,1% (82/132) foram genotipicamente caracterizadas como O157:H7. 41,5% (34/82) das amostras O157:H7 foram sorbitol- e 74,4% (61/82) móveis. Das amostras caracterizadas somente como O157, 20% (10/50) foram imóveis.

Estes resultados diferem de estudos de Cerqueira e colaboradores (1999) e Irino e colaboradores (2005) que encontraram menores taxas de STEC O157:H7 nos estados do Rio de Janeiro (1,5%) e de São Paulo (0,1%), respectivamente.^{41,91} Essa diferença pode estar relacionada com as metodologias utilizadas para coleta, isolamento, diagnóstico e até mesmo às características do gado envolvido.

Neste estudo todas as amostras *eae*⁺, com exceção de duas, pertenceram ao sorotipo O157:H7. Somente as amostras BSP 047 III, de Ji-Paraná e BSP 026 III, de Presidente Médice, foram positivas para o sorogrupo O113, comumente associado a cepas LEE-negativas.^{14,101}

Esses resultados corroboram estudos prévios que reconhecem o sorogrupo O157 e o sorotipo O157:H7, nos estados do Rio de Janeiro e de Rondônia, como um relevante representante do patotipo STEC, principalmente, considerando a associação detectada com os marcadores de virulência que são comumente descritos em casos clínicos de grande severidade. A detecção do sorogrupo O113 entre as amostras de RO

mais uma vez reforça a constatação da maior variabilidade entre os microrganismos pertencentes a essa população bacteriana.

5.4 Agrupamento filogenético de STEC

As linhagens patogênicas de *E. coli* agente de doenças extra intestinais têm sido classificadas pela literatura como pertencentes, em sua maioria, ao grupo B2 e, em menor escala, ao grupo D; as comensais pertencem em sua maioria ao grupo A e, em menor proporção, no grupo B1 e as agentes de doença diarreica são encontradas como membros dos grupos A, B1 e D.^{68,69} No presente estudo os resultados permitiram classificar as amostras de *E. coli* carreadoras de *stx* nos quatro filogrupos genéticos existentes.⁶⁹ As amostras foram classificadas principalmente no grupo B1 (47,3%) seguindo-se os grupos A (44,9%), D (6,6%) e B2 (1,2%).

Analisando-se por estado, no Rio de Janeiro o grupo filogenético A representou a maioria das amostras de STEC com 58,3% (14/24) das amostras, seguido do filogrupo B1 com 25% (6/24) e dos filogrupos D e B2 ambos com 8,3% (2/24). No estado de Rondônia prevaleceu o filogrupo B1 com 51% (73/143), seguido dos filogrupos A representando 42,7% (61/143) e D com 6,3% (9/143), não havendo nenhuma amostra pertencente ao filogrupo B2.

A maior representação das amostras STEC de origem bovina nos filogrupos B1 e A, nos estados de Rondônia e do Rio de Janeiro, corrobora com resultados encontrados em outros estudos, assim como a presença, em menor proporção, do filogrupo D em ambos os estados.^{73,75,102} A detecção do filogrupo B2, predominante para linhagens extras intestinais, foi encontrado somente nas amostras do Rio de Janeiro. Esse filogrupo costuma ser menos frequente em amostras de STEC, como já descrito.⁷³

Estudos filogenéticos são de grande importância para o conhecimento e entendimento da diversidade e do potencial de virulência bacteriana entre amostras isoladas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. Nossos resultados reforçam observações prévias que identificam o potencial de virulência desses microrganismos no mesmo grupo onde são majoritariamente classificadas amostras de origem ambiental.

5.5 Amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR)

O ensaio de amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) é amplamente utilizado para análise de relações de identidade genética entre amostras de *E. coli*. Este método de tipagem molecular permitiu identificar a estrutura clonal e a estreita associação de perfis eletroforéticos com características epidemiológicas e grupo-específicas entre amostras de *E. coli* provenientes de diferentes origens.^{66,67}

No presente estudo, o RAPD-PCR permitiu detectar que a população de *E. coli* carreadora do gene *stx* estudada é geneticamente diversa sugerindo que estas amostras possuem natureza não-clonal. As amostras STEC O157:H7 detectadas neste estudo encontram-se dispersas por toda a árvore gênica, sugerindo uma grande diversidade genética dentro deste sorotipo, já demonstrada em outros trabalhos.¹⁰³

Uma relação mais estreita foi observada entre os isolados que compartilham origem de isolamento e as demais características biogenéticas investigadas. A detecção de perfis eletroforéticos idênticos entre si entre amostras isoladas de um mesmo animal ou de uma mesma propriedade, sugere a circulação de uma mesma estirpe no ambiente. Um mesmo perfil eletroforético de RAPD-PCR foi detectado entre amostras de regiões distintas, sendo três amostras do bovino nº 29 (amostras 029 I, 029 II e 029 III), pertencente à Estância Laiz localizada no município de Presidente Médice e três amostras do animal nº 33 (033 II, 033 III e 033 IV), pertencente à Fazenda 7 de Setembro, localizada no município de Corumbiaria, ambos municípios localizados em Rondônia. Estas amostras apesar de terem apresentado o mesmo perfil de RAPD-PCR, o mesmo sorotipo e mesmo grupo filogenético, apresentaram perfis de virulência diferentes, exceto as amostras BSP 029 II e BSP 029 III que apresentaram o mesmo genótipo *stx₂/eae*. Possivelmente isso é um reflexo do elevado intercâmbio genético entre as subpopulações bacterianas que, através dos diferentes mecanismos de transferência gênica, incorporam ou perdem sequencias genéticas.

6. CONCLUSÕES

- O estudo contribuiu para o conhecimento sobre a circulação de amostras bacterianas de *Escherichia coli* carreadoras dos genes *stx*, nas propriedades rurais leiteiras dos estados do Rio de Janeiro e de Rondônia, sendo de relevância econômica, social e para a saúde pública;
- A elevada prevalência do sorogrupo O157 e, em especial, do sorotipo O157:H7, nos estados do Rio de Janeiro e de Rondônia, reforça o reconhecimento sobre a importância desse sorotipo dentre as STEC, principalmente considerando a associação desse marcador com casos clínicos de grande severidade em humanos;
- A existência de amostras STEC O113 carreadoras do gene *eae*, sugere que esse sorogrupo, normalmente LEE-negativo, também pode ser um carreador desse gene de virulência.
- A amplificação randômica do DNA polimórfico detectou elevada diversidade bacteriana entre as subpopulações de STEC isoladas do Rio de Janeiro e Rondônia, indicando uma estrutura genética de origem não clonal;
- A detecção de perfis RAPD idênticos entre si entre amostras bacterianas isoladas de uma mesma propriedade indica a circulação de cepas particulares de STEC em um mesmo ambiente;
- A filotipagem permitiu a classificação majoritária das amostras STEC, isoladas do Rio de Janeiro e Rondônia, nos grupos filogenéticos A e B1, onde comumente são agrupadas amostras de *E. coli* de origem ambiental e diarréiogênicas.
- A variabilidade dos marcadores genéticos de virulência sugere refletir o elevado intercâmbio genético entre as subpopulações bacterianas, que através dos diferentes mecanismos de transferência gênica, incorporam ou perdem sequências;

- A elevada prevalência de alelos não tipáveis na região LEE sugere o envolvimento de moléculas não investigadas, ou ainda não descritas, nas etapas de adesão bacteriana.
- As amostras STEC obtidas de Rondônia, quando comparadas com as do Rio de Janeiro, podem carrear um potencial de virulência adicional, uma vez que os maiores percentuais para os genes *ehxA* e *eae* foram detectados entre seus isolados.
- As características da ordenha e manejo, as condições de higiene e a infraestrutura nas propriedades rurais de Rondônia, podem contribuir para a circulação desses microrganismos patogênicos em ambientes diversos, favorecendo a contaminação dos sistemas de produção leiteira e seus derivados;
- Nossos estudos contribuíram com os aspectos da epidemiologia molecular das STEC, em especial, os relacionados à virulência desses patógenos circulantes, principalmente no estado de Rondônia, onde os relatos ainda são limitados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Bertão AMS, Saridakis HO. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. 2007; 28(2): 81-92.
- 2- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 2005; 36(3): 289-311.
- 3- Torres AG, Arenas-Hernández MMP, Martínez-Laguna Y. Overview of *Escherichia coli*. In: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America; 2010. p. 1-7.
- 4- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 26-38.
- 5- Nataro JP, Kaper B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 142-201.
- 6- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(3): 450-479.
- 7- Vaz TMI, Irino K, Kato MAMF, Dias ÂMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM, Guth BEC. Virulence properties and characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. J Clin Microbiol. 2004; 42(2): 903-5.
- 8- Guth BEC, Ramos SRTS, Cerqueira AMF, Andrade JRC, Gomes TAT. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(8): 1085-89.
- 9- Hunt JM. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Clin Lab Med. 2010; 30: 21-45.

- 10- Aspán A, Eriksson E. Verotoxigenic *E. coli* O157:H7 from Swedish cattle; isolates from prevalence studies versus strains linked to human infections – a retrospective study. *BMC Vet Res.* 2010; 6(7): 1-10.
- 11- Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, Schaben C, Crielly AS, Gage R, Baysinger M, Moll M, Withers M, Toney DM, Hunter SB, Hoekstra M, Wong SK, Griffin PM, Gilder TJV. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med.* 2002; 347(8): 555-560.
- 12- Ogden ID, Hepburn NF, Macrae M, Strachan NJC, Felon DR, Rusbridge SM, Pennington TH. Long term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following and outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol.* 2002; 34: 100-4.
- 13- Guth BEC, Prado V, Rivas M. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; 2010. p. 65-83.
- 14- Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(10): 3357-61.
- 15- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1977; 18(3): 775-9.
- 16- O'Brien AD, Laveck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1982; 146(6): 763-9.
- 17- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 1983; 308(12): 681-5.
- 18- Swerdlow DA, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnel Jr D, Geldreich E, Payne BJ, Meyer Jr A, Wells JG, Greene KD, Bright M; Bean NH,

- Blake PA. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med.* 1992; 117(10): 812-819.
- 19- Paton AW, Ratcliff RM, Doyle RM, Seymour-Murray J, Davos D, Lanser JA, Paton JC. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(7): 1622-7.
- 20- Fukushima H, Hashizume T, Kitani T. The massive outbreak of *E. coli* O157 infections by food poisoning among the elementary school children in Sakai, Japan in 1996 In: III International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, 1997; Baltimore. p. 111, Summary n. V6/VII.
- 21- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, An Der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Gérard K. Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – Preliminary report. *N Engl J Med.* 2011, 365(19): 1771-80.
- 22- Pigatto CP. Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos de corte do estado do Paraná [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2008.
- 23- China B, Pirson V, Mainil J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62(9): 3462-65.
- 24- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: 45-62.
- 25- Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL. A positive regulatory loop controls expression of the Locus of Enterocyte Effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol.* 2005; 187(23): 7918-30.

- 26- Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco J, Parro V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. Clin Chem. 2006; 52(2): 192-201.
- 27- Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, Alonso MP, Vieira MAM, Hernandez RT, Abe CM, Piazza RMF, Lacher DW, Elias WP, Gomes TAT, Blanco J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. Int Microbiol. 2009; 12: 243-251.
- 28- China B, Goffaux F, Pirson V, Mainil J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 1999; 178(1): 177-182.
- 29- Ethelberg S, Olsen KEP, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Engberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mölbak K. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg Infect Dis. 2004; 10(5): 842-7.
- 30- Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay BB, Karmali MA. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(7): 2153-60.
- 31- Schmidt H, Geitz C, Tarr PI, Frosch M, Karch H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence of clonality. J Infect Dis. 1999; 179: 115-123.
- 32- Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun. 1995; 63(3): 1055-61.

- 33- Law D, Kelly J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga like toxin producing *E. coli* serogroups. *Infect Immun.* 1995; 63(2): 700-2.
- 34- Taneike I, Zhang HM, Wakisaka-Saito N, Yamamoto T. Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett.* 2002 524: 219-224.
- 35- López EL, Prado-Jiménez V, O’Ryan-Gallardo M, Contrini MM. *Shigella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 2000; 14(1): 41-65.
- 36- Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Pereira da Silva LH. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(4): 507-517.
- 37- Rosa ACP, Mariano AT, Pereira AMS, Tibana A, Gomes TAT, Andrade JCR. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol.* 1998; 47: 781-790.
- 38- Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Andrade JCR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect.* 2004; 48(2), 161-7.
- 39- Castro AFP, Bentancor A, Mercado EC, *et al.* *Escherichia coli* Animal Reservoirs, Transmission Route and Animal Disease. In: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.* 2010. p.223-248.
- 40- Pruijboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JD, Cornick NA, Moon HW. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *PNAS.* 2000; 97(19): 10325-29.

- 41- Cerqueira AMF, Guth BEC, Joaquim RM, Andrade JRC. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol.* 1999; 70: 111-121.
- 42- Tristão LCS, Gonzalez AGM, Coutinho CAS, Cerqueira AMF, Gomes MJP, Irino K, Guth BEC, Andrade JRC. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Vet Microbiol.* 2007; 119: 358-365.
- 43- Cray WC, Moon HM. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(4): 1586-15.
- 44- Garber LP, Wells SJ, Hancock DD, Doyle MP, Tuttle J, Shere JA, Zhao T. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 207(1): 46-49.
- 45- Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect.* 1997; 119: 245–250.
- 46- Dunn, JR., Keen JE, Thompson RA. Prevalence of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 224: 1151–1158.
- 47- Vettorato MP. Estudo da frequência e caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC) isoladas de ovinos no estado de São Paulo [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
- 48- Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 1993; 31(9): 2483-88.
- 49- Djordjevic SP, Hornitzky MA, Bailey G, Gill P, Vanselow B, Walker K, Bettelheim KA. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. J Clin Microbiol. 2001; 39(5): 2017-21.
- 50- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, *et al.* Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J Clin Microbiol. 2003; 41(4): 1351-56.
- 51- Bielaszewska M, Janda J, Bláhová K *et al.* Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. Epidemiol Infect. 1997; 119: 299-305.
- 52- Oliveira MG, Brito JRF, Carvalho RR, Guth BEC, Gomes TA, Vieira MA, Kato MA, Ramos II, Vaz TM, Irino K. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73(18): 5945-48.
- 53- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(3): 1205-08.
- 54- Makino S, Kobori H, Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, Tsukamoto T. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. Epidemiol Infect. 2000; 125: 55-61.
- 55- Dipineto L, Santaniello A, Fontanella M, Lagos K, Fioretti A, Menna LF. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. Lett Appl Microbiol. 2006; 43(3): 293-5.
- 56- Dunn JR, Keen JE, Moreland D, Thompson RA. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana. J Wildl Dis. 2004; 40(2): 361-5.
- 57- Nielsen EM, Skov MN, Madsen JJ, Lodal J, Jespersen JB, Baggesen DL. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to Farms. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(11): 6944-7.

- 58- Gütler V, Mayall BC. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int J of Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 3-16.
- 59- Regua-Mangia AH, Guth BC, Andrade JRC, Irino K, Pacheco ABF, Ferreira LCS, Zahner V, Teixeira LM. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004; 40(2): 155-162.
- 60- Piazza RMF, Abe CM, Horton DSPQ, Miliwebsky E, Chinen I, Vaz TMI, Irino K. Detection and subtyping methods of diarrheagenic *Escherichia coli* strains. In: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; 2010. p. 95-115.
- 61- McKee, ML, O'Brien AD. Investigation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infect Immun.* 1995; 63(5): 2070-74.
- 62- Bettelheim KA, Beutin L. Rapid laboratory identification and characterization of verotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J Appl Microbiol.* 2003; 95(2): 205-217.
- 63- Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995; 12: 85-90.
- 64- Persson A, Olsen KEP, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 516-524.
- 65- Foley SL, Lynne AM & Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Review. *Infect Genet Evol.* 2009, 9: 430–440.
- 66- Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Irino K, Teixeira LM. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains

- isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *J Med Microbiol.* 2009; 58, 414–422.
- 67- Pacheco ABF, Guth BEC, Soares KCC, Nishimura L, Almeida DF, Ferreira LCS. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1521-1525.
- 68- Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol.* 2008; 10: 2484-96.
- 69- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 4555-58.
- 70- Davis MA, Hancock DD, Besser TE, Call DR. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5): 1843-49.
- 71- Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(12): 3013-17.
- 72- Regua-Mangia AH, Bezerra RMP, Esparis CM, Teixeira LM. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. *Revista de Patologia Tropical.* 2009; 38: 27-34.
- 73- Girardeau JP, Dalmaso A, Bertin Y; Ducrot C, Bord S, Livrelli V, Vernozzy-Rozand C, Martin C. Association of Virulence Genotype with Phylogenetic Background in Comparison to Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(12): 6098–6107.

- 74- Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E: *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol.* 1998; 15: 1685-1695.
- 75- Son I, Kessel JASV, Karns JS. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathog Dis.* 2009, 6(7): 837-847.
- 76- Koo HJ, Kwak HS, Yoon SH, Woo GJ. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012; 28: 1813-16.
- 77- Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MIZ, Gomes TAT, Amaral LA, Ottoboni LMM. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* 2010; 10(161): 1-10.
- 78- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittlemen JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases [letter]. *Nature.* 2008; 451: 990–3.
- 79- Slingenbergh J, Gilbert M, Balogh K, Wint W. Ecological sources of zoonotic diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2004; 23(2): 467-484.
- 80- Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis.* 1995; 1(1), 7-15.
- 81- Martins P. Zoonoses num mundo globalizado: riscos e mitos. *AveWorld*, 2008 ago/set; 35(6): 46-57.
- 82- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.* 2004; 430: 242-9.
- 83- Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condron R, Reu KD, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Miszczycha S, Moussiegt S, Verstraete K, Cerf O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy

- production. *Int J Food Microbiol.* 2012 [acesso em 2012 dez 21], 23p.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>
- 84- Stevens MP, Van Diemen PM, Dziva F, Jones PW, Wallis TS. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiol.* 2002; 148: 3767-78.
- 85- Rahn K, Renwick AS, Johson RP, Wilson JB, Clark RC, Alves D, McEwen S, Lior H, Spika J. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol Infect.* 1997; 119: 251-259.
- 86- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª ed. São Paulo: Medicina pan-americana editora do Brasil Ltda.; 2008. 1565 p.
- 87- 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*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(2): 598–602.
- 88- Paton AW, Paton JC. Direct detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157 and O113 by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(10): 3362-5.
- 89- China B, Goffaux F, Pirson C, Mainil J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Letters.* 1999; 178: 177-182.
- 90- Gordillo R, Córdoba JJ, Andrade MJ, Luque MI, Rodríguez M. Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. *Meat Sci.* 2011; 8: 767-773.
- 91- Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Ramos II, Souza MAC, Cruz AS, Gomes TAT, Vieira MAM, Guth BEC. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 2005; 105: 29-36.

- 92- Oliveira MG, Brito JRF, Gomes TAT, Guth BEC, Vieira MAM, Naves ZVF, Vaz TMI, Irino K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *Int J Food Microbiol.* 2008; 127: 139-146.
- 93- Timm CD, Irino K, Gomes TAT, Vieira MM, Guth BEC, Vaz TMI, Moreira CN, Aleixo JAG. Virulence Markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 2007; 44: 419-425.
- 94- Vicente HIG, Amaral LA, Nunes AP, Lorenzon CS. *Escherichia coli*, produtoras de Shigatoxinas detectadas em fezes de bovinos leiteiros. *Arq Inst Biol.* 2010; 77(4): 567-573.
- 95- Boerlin P, McEwen AS, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3): 497-503.
- 96- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1): 1099-1108.
- 97- Welinder-Olsson C, Badenfors M, Cheasty T, Kjellin E, Kaijser B. Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 959-964.
- 98- Guth BEC, Chinen I, Miliwebsky E, Cerqueira AMF, Chillemi G, Andrade JRC, Baschkier A, Rivas M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. *Vet. Microbiol.* 2003; 92: 335-349.
- 99- Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(6): 2043-49.

- 100- Stephan R, Borel N, Zweifel C, Blanco M, Blanco J. First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle. BMC Microbiol. 2004; 4: 10.
- 101- Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschäpe H, Karch H. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. J Clin Microbiol. 2003; 41(6): 2448-53.
- 102- Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M, Joerger R. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. J Microbiol Methods. 2007, 70: 227-235.
- 103- Regua-Mangia AH, Gonzalez AGM, Cerqueira AMF, Andrade JRC. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from different sources and geographic regions. J Vet Sci. 2012; 13(2): 139-144.

ANEXO 1 – Questionário epidemiológico

FICHA EPIDEMIOLÓGICA RESUMIDA

Data de coleta:

Identificação do animal:

Propriedade:

Localidade:

Município:

Estado:

Proprietário:

1 – Características do animal:

1.1) Idade:

1.2) Gado: Leite () Corte () Mista ()

1.3) Animal saudável: () sim () não

1.4) Presença de enteropatias: () sim () não

1.5) Presença de muco nas fezes: () sim () não

1.6) Presença de sangue nas fezes: () sim () não

Obs.....

.....

.....

2 – Recursos Tecnológicos gerais e no que se refere aos investimentos em instalações:

2.1) Presença de estábulo? sim (); não ().

2.2) Presença de fábrica de ração? sim (); não ().

2.3) Presença de silos? sim (); não ().

2.4) Presença de sala de ordenha? sim (); não ().

- 2.5) Tipo de ordenha : manual () ; mecânica ()
- 2.6) Tipo de produção : leite () ; leite e outros derivados ().

Obs.....
.....
.....

ANEXO 2 – Soluções utilizadas

1) Reagentes e soluções utilizadas nos ensaios de PCR

1.1) Solução tampão Tris-EDTA (TE), pH 7.5

Tris-HCl (LGC Biotecnologia [®])	10 Mm
EDTA (LGC Biotecnologia [®])	0,1 mM

1.2) Gel de agarose 1,0% (p/v)

UltraPure Agarose (Invitrogen [®])	1,0%
TBE 0,5X q.s.p.	100 mL

1.3) Gel de agarose 1,2% (p/v)

UltraPure Agarose (Invitrogen [®])	1,2%
TBE 0,5X q.s.p.	100 mL

1.3) Gel de agarose 1,5% (p/v)

UltraPure Agarose (Invitrogen [®])	1,5%
TBE 0,5X q.s.p.	100 mL

1.4) Gel de agarose 2,0% (p/v)

UltraPure Agarose (Invitrogen [®])	2,0%
TBE 0,5X q.s.p.	100 mL

1.5) Corante para eletroforese de DNA

Azul de bromofenol	0,005 g
Xilenocianol	0,005 g
Glicerol P.A.	7 mL
Água deionizada	3 mL

1.6) GelRed Nucleic Acid Stain (10.000X, Biotin®)

Gel Red 10.000X	1 µL
Água deionizada q.s.p	500 µL

2) Soluções de cultivo de bactérias

2.1) TSA - ágar de tripticaseína de soja (Difco®)

TSA	40g
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

2.2) TSB - caldo de tripticaseína de soja (Difco®)

TSB	30g
Água deionizada q.s.p.	1000 mL