

THIAGO DE BRITO PINHEIRO
VALÉRIO MONTEIRO NETO

PROPRIEDADES DE ADESÃO
E CITOTOXICIDADE DE
ISOLADOS
DE *Escherichia coli*
PRODUTORA DA TOXINA
DE SHIGA (STEC)
DE ORIGEM BOVINA

THIAGO DE BRITO PINHEIRO
VALÉRIO MONTEIRO NETO

PROPRIEDADES DE ADESÃO
E CITOTOXICIDADE DE
ISOLADOS
DE *Escherichia coli*
PRODUTORA DA TOXINA
DE SHIGA (STEC)
DE ORIGEM BOVINA

Editora chefe	
Prof ^a Dr ^a Antonella Carvalho de Oliveira	
Editora executiva	
Natalia Oliveira	
Assistente editorial	
Flávia Roberta Barão	
Bibliotecária	2023 by Atena Editora
Janaina Ramos	Copyright © Atena Editora
Projeto gráfico	Copyright do texto © 2023 Os autores
Camila Alves de Cremo	Copyright da edição © 2023 Atena
Luiza Alves Batista	Editora
Imagens da capa	Direitos para esta edição cedidos à
iStock	Atena Editora pelos autores.
Edição de arte	Open access publication by Atena
Luiza Alves Batista	Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof^a Dr^a Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Prof^a Dr^a Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof^a Dr^a Camila Pereira – Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Cirênia de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

- Prof^a Dr^a Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Prof^a Dr^a Danyelle Andrade Mota – Universidade Tiradentes
Prof. Dr. Davi Oliveira Bizerril – Universidade de Fortaleza
Prof^a Dr^a Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof^a Dr^a Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Prof^a Dr^a Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Prof^a Dr^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof^a Dr^a Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^a Dr^a Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof^a Dr^a Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Prof^a Dr^a Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Guillermo Alberto López – Instituto Federal da Bahia
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Prof^a Dr^a Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPar
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Prof^a Dr^a Kelly Lopes de Araujo Appel – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal
Prof^a Dr^a Larissa Maranhão Dias – Instituto Federal do Amapá
Prof^a Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof^a Dr^a Luciana Martins Zuliani – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Prof^a Dr^a Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^a Dr^a Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Max da Silva Ferreira – Universidade do Grande Rio
Prof^a Dr^a Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^a Dr^a Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Prof^a Dr^a Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^a Dr^a Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Prof^a Dr^a Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Taísa Ceratti Treptow – Universidade Federal de Santa Maria
Prof^a Dr^a Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Prof^a Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^a Dr^a Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Propriedades de adesão e citotoxicidade de isolados de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) de origem bovina

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Yaiddy Paola Martinez
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Autores: Thiago de Brito Pinheiro
Valério Monteiro Neto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
P654	Pinheiro, Thiago de Brito Propriedades de adesão e citotoxicidade de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga (STEC) de origem bovina / Thiago de Brito Pinheiro, Valério Monteiro Neto. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-1260-1 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.601232303 1. Patologia veterinária. I. Pinheiro, Thiago de Brito. II. Neto, Valério Monteiro. III. Título. CDD 636.089607
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declararam que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, que me protegeu durante a realização deste trabalho.

À minha esposa Daysée Daniele e aos meus filhos Lorenzo e Valentim, pelo carinho, compreensão nos momentos de minha ausência e pelo constante incentivo.

Ao Professor e orientador Dr. Valério Monteiro Neto, que conduziu esse projeto com muito interesse e competência.

Às Professoras Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim, Dra. Cristina de Andrade Monteiro e Dr. Silvio Gomes Monteiro, pelo auxílio e prontidão.

Aos colegas de laboratório, em especial, Francyelle, Monique, Francisca Noronha, Carliane, Ênnio, Thiago Ferro e Adriana pela colaboração direta ou indireta para com este trabalho.

Ao meu pai Tobias *in memoriam*, minha mãe Dulce e minha irmã Thamires pelo sempre e incondicional carinho e estímulo.

À Universidade CEUMA, em especial ao departamento de Pesquisa de Biologia Parasitária.

“O que faz andar o barco não é a vela enfunada, mas o vento que não se vê.”

Platão

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
Aspectos Gerais	6
Histórico	7
Epidemiologia	8
Incidência de infecções causadas por STEC	9
Toxinas	10
Adesão	12
Adesinas	13
OBJETIVOS	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Isolados bacterianos	16
Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a verificação da presença dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eaeA</i>	16
Adesão bacteriana às células HeLa e HEp-2	17
Cultivo e preparo das monocamadas celulares	17
Teste de adesão às células HeLa e HEp-2	17
Ensaio de hemaglutinação manose-sensível e manose-resistente	18
Identificação da expressão de fimbria Curli	18
Detecção da produção de biofilme por espectrofotometria	18
Determinação da hidrofobicidade de superfície celular	19
Pesquisa dos genes de adesinas Saa, Iha, Efa1, LpfAO113, EhaA e da citotoxina SubA	19

SUMÁRIO

Análise estatística	20
RESULTADOS	21
Pesquisa dos genes codificadores de citotoxinas.....	21
Adesão às células humanas	22
Pesquisa das propriedades relacionadas com a adesão.....	25
Pesquisa dos genes de adesinas	26
Relação entre as propriedades de adesão e a capacidade de adesão às células eucarióticas.....	27
Relação entre a presença dos genes de adesinas e a capacidade de adesão às células eucarióticas.....	28
Relação entre a presença dos genes de adesinas e as propriedades de adesão.....	28
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
SOBRE OS AUTORES	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E: adesão e destruição (do inglês: *attaching and effacing*)

BHI – Infusão de Cérebro e Coração (do inglês: *Brain Heart Infusion*)

CH – Colite hemorrágica

DAEC – *Escherichia coli* de adesão difusa (do inglês: *Diffusely adherent Escherichia coli*)

Doc – Densidade ótica do controle

Doi – Densidade ótica do isolado

EAEC – *Escherichia coli* Enteroaggregativa (do inglês: *Enteroaggregative E. coli*)

ECD – *Escherichia coli* Diarreogênica (do inglês: *Diarrheagenic E. coli*)

Efa1 – Fator de aderência de EHEC (do inglês: *EHEC factor for adherence*)

Eha – Autotransportadora de EHEC (do inglês: *EHEC autotransporter*)

EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica (do inglês: *Enterohemorrhagic E. coli*)

EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasora (do inglês: *Enteroinvasive E. coli*)

EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica (do inglês: *Enteropathogenic E. coli*)

ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica (do inglês: *Enterotoxigenic E. coli*)

Gb3 – Globotriásilceramida

Gb4 – Globotetrasilceramida

Iha – Adesina homóloga da IrgA de *Vibrio Cholerae* (do inglês: *IrgA homologue adhesin of Vibrio cholerae*)

LB – Caldo Luria-Bertani

LEE – *Locus* de destruição do enterócito (do inglês: *locus of enterocyte effacement*)

Lesão A/E – Lesão *attaching and effacing*

lfp – Fimbria polar longa (do inglês: *Long polar fimbriae*)

MEM – Meio mínimo essencial (do inglês: *minimal essential medium*)

MRHA: Hemaglutinação manose-resistente

MSHA: Hemaglutinação manose-sensível

OMP – Proteína de membrana externa (do inglês: *outer membrane protein*)

ORF – Janela aberta de leitura (do inglês: *Open reading frame*)

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

pH – Potencial hidrogeniônico

PTT – Púrpura trombocitopênica trombótica

rbs – Sítio de ligação do ribossomo (do inglês: *ribosome binding site*)

Saa – Adesina auto-aglutinante de STEC (do inglês: *STEC autoagglutinating adhesin*)

SFB – Soro fetal bovino

SHU – Síndrome hemolítico-urêmica

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (do inglês: *Shiga toxin-producing E. coli*)

Stx1 – Toxina de Shiga 1

Stx2 – Toxina de Shiga 2

SubA – Subtilase A

UFC – Unidade formadora de colônia

RESUMO

Escherichia coli produtoras da toxina de Shiga (STEC) são patógenos veiculados por alimentos capazes de causar desde diarreia branda até quadros mais severos e sanguinolentos, podendo evoluir para complicações graves, como colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica e púrpura trombocitopênica. Esses microrganismos têm sido associados a numerosos surtos e casos esporádicos de infecções intestinais em todo o mundo devido ao consumo de alimentos contaminados. O presente estudo teve como objetivo caracterizar em nível fenotípico e molecular as propriedades de adesão e citotoxicidade de isolados de STEC provenientes de fezes bovinas em células humanas. Verificou-se que o gene da citotoxina Stx2 foi o mais presente na maioria dos isolados (81%), seguida pelo gene da subtilase A (71,4%). A adesão ocorreu nas duas linhagens celulares pesquisadas, porém de forma heterogênea, sendo prevalente nas células HEp-2 e foi observado que todas as quatro propriedades de adesão analisadas: formação de biofilme, hemoaglutinação, expressão de fimbria curli e hidrofobicidade podem influenciar no processo de adesão das STEC à células HEp-2, porém não interferiram neste processo em células HeLa. Evidenciou-se também que as adesinas LpfAO113 e EhaA foram as mais frequentes dentre os 21 isolados estudados e foram as únicas que tiveram influência no processo de adesão às células HEp-2 e na expressão das propriedades relacionadas com a adesão. Desta forma, pode-se concluir que os isolados de STEC analisados têm o potencial de infectar e lesar células humanas *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Adesão, adesinas, citotoxinas, STEC.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens capable of causing from mild to severe and bloody diarrhea, which may progress to serious complications, such as hemorrhagic colitis, hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. These microorganisms have been associated with several outbreaks and sporadic cases of intestinal infections worldwide due to consumption of contaminated food. The present study aims to characterize the phenotypic and molecular level in the adhesion properties of STEC isolates from cattle stools in human cells. The cytotoxin Stx2 gene was present in the majority of isolates (81%), followed by the subtilase A gene (71.4%). The bacterial adherence occurred in both cell lines in an heterogeneous manner, principally on HEp-2 cells. All four adhesion properties analyzed: biofilm formation, hemagglutination, curli fimbriae expression and hydrophobicity, influenced the process adhesion of STEC on HEp-2 cells, but did not interfere in adherence to HeLa cells. It was also evident that LpfAO113 and EhaA adhesins were the most frequent among 21 isolates and were the ones that influenced the adhesion process on HEp-2 cells and in the adhesion properties. Thus, it can be concluded that the STEC isolates analyzed has the potential to infect and to cause toxic effects in human cells *in vitro*.

KEYWORDS: Adhesion, adhesins, citotoxins, STEC.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, primeiramente sob a denominação de *Bacillus coli comune*. Porém, após uma revisão, foi renomeada para *Escherichia coli* em referência ao pesquisador que a descobriu (FRANKEL; CHEN, 2005).

Esta espécie de bastonete Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, podendo ser móvel ou imóvel (NATARO; KAPER, 1998). Trata-se de um importante constituinte da microbiota entérica de mamíferos e aves (GYLES, 1993).

Algumas cepas podem causar infecção intestinal e constituem as categorias de *E. coli* diarreogênicas (ECD). Atualmente existem seis categorias, considerando seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*. Esses patótipos de *E. coli* diarreogênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroaggregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

Alguns desses patótipos incluem microrganismos bastante diferentes. Sendo assim, as EAEC e EPEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) (MOBLEY; KAPER; NATARO, 2004).

O subgrupo das EHEC, além de diarreia sanguinolenta, pode levar à falência renal, ocasionando a síndrome hemolítica urêmica (SHU) em humanos. Tais cepas também são capazes de ocasionar a lesão designada de *attaching and effacing* (A/E), que envolve a adesão bacteriana ao epitélio intestinal e destruição das microvilosidades (MAINIL, 1999).

Dois grupos de toxina de Shiga (Stx1 e Stx2) podem ser sintetizados por STEC. Estas citotoxinas recebem este nome por serem iguais a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* 1 e seus receptores são encontrados em células renais e intestinais. A produção de Stx e enterohemolisina e a capacidade de causar lesão A/E estão envolvidos com a patogenicidade de STEC. A ligação de Stx aos receptores causa morte das células por inibição de síntese protéica, causando enterocolite hemorrágica e falência renal (NATARO; KAPER, 1998).

Cepas de STEC já foram isoladas de animais domésticos, ovelhas, mosquitos, gaivotas, veados, coelhos, javali, alce, pombos e pássaros, sem, contudo, ficar esclarecido se estes animais atuavam como hospedeiros naturais ou vetores deste patógeno (MAKINO et al., 2000). Os bovinos são reservatórios naturais destas cepas, encontradas na microbiota de vários animais. Sua transmissão ocorre a partir de carne mal cozida, produtos não pasteurizados e vegetais e água contaminados por fezes. Estas bactérias aderem-se ao

epitélio intestinal e colonizam o tubo digestivo, de forma assintomática ou ocasionando diarreia (NATARO; KAPER, 1998; GARCÍA-ALJARO et al., 2005).

Um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde, de 2000 a 2003, constatou que 73% dos 10,6 milhões de mortes anuais de crianças menores de cinco anos estavam relacionados a cinco causas, sendo a doença diarréica a segunda mais comum com 18%, depois da pneumonia com 19%, o que demonstra a importância da enfermidade para a saúde pública, uma vez que causa profundos impactos sobre as taxas de morbimortalidade infantil, principalmente nas regiões menos desenvolvidas do mundo (BRYCE et al., 2005).

Portanto, diante do exposto anteriormente e, considerando que o rebanho bovino é o principal reservatório desta bactéria, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de comprovar se os isolados de STEC destes animais apresentam propriedades de virulência que os habilita a provocar infecções em células humanas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 | ASPECTOS GERAIS

Amostras de *E. coli* podem causar grande variedade de doenças, tanto no homem quanto em outros animais. Dentre essas doenças, as mais comuns são diarreia e disenteria, e ocasionalmente também pode ocorrer a síndrome hemolítico urêmica (SHU), colite hemorrágica (CH), pielonefrite, cistite, septicemia, pneumonia e meningite. Em geral, diferentes amostras estão associadas com doenças diversas, podendo apresentar um ou mais fatores ou mecanismos de virulência (SALYERS; WHITT, 1994).

Dentre as distintas categorias de *E. coli* diarreogênicas, as STEC merecem destaque como bactérias emergentes relacionadas com a ingestão de água e alimentos, uma vez que a doença causada por estas bactérias varia desde uma diarreia branda até severas diarreias sanguinolentas (colites hemorrágicas – CH) que podem evoluir para complicações extra-intestinais graves como a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), sendo que o grupo de amostras relacionado a estes agravos é denominado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (MORA et al., 2005). As EHEC constituem, portanto, um subgrupo das STEC (JOHNSON et al., 1983; WHIPP et al., 1994).

EHEC é um patógeno intestinal capaz de causar doença em humanos com um número baixo de unidades formadoras de colônias (UFCs). Crianças menores de 10 anos e idosos constituem os principais grupos de risco que podem desenvolver SHU (GRIFFIN; TAUXE, 1991). Em aproximadamente 3 a 5% das crianças afetadas, a SHU é fatal, enquanto que 12 a 30% sofrem comprometimento na função renal ou lesão neurológica (NATARO; KAPER, 1998; PATON; PATON, 1998b).

Amostras de EHEC se caracterizam por expressarem um fenótipo denominado lesão A/E (*attaching and effacing*) que caracterizam toda a patogênese das infecções por EHEC. Neste fenótipo, a bactéria se adere no enterócito, célula característica do intestino grosso humano, responsável pela absorção de líquidos e nutrientes e rica em microvilosidades. Nesse local a EHEC irá destruir estas microvilosidades, causando a formação de pedais que irão ancorar a bactéria na superfície celular, promovendo uma adesão íntima. Assim a bactéria poderá internalizar suas toxinas (Stx1 e/ou Stx2) no citoplasma celular, através de um sistema de secreção tipo III. As toxinas de Shiga irão inibir a síntese protéica podendo levar, consequentemente, à morte celular. A seguir segue uma figura para ilustrar este mecanismo (Adaptado de Mobley, et al., 2004)

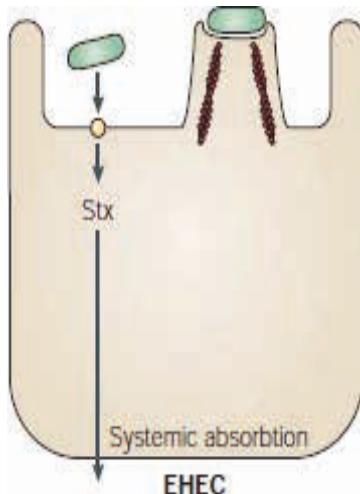


Figura 1. **Patogênese da lesão por EHEC.** EHEC induz a lesão A/E no cólon, internalizando as toxinas de Shiga (Stx) podendo ocasionar absorção sistêmica, levando às complicações potencialmente fatais. (Adaptado de MOBLEY et al., 2005).

2 | HISTÓRICO

Em 1955, a síndrome hemolítica urêmica foi descrita e caracterizada primeiramente por Gasser, como um quadro de insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática. Em 1977, Konowalchuk et al. demonstraram que determinadas estirpes de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com diarreia produziam, uma até então desconhecida, citotoxina com efeito letal sobre células Vero.

Durante a investigação de dois surtos de colite hemorrágica e SHU, ocorridos em 1982, foi constatado que ambos estavam associados a *E. coli* do sorotipo O157:H7, até então de ocorrência rara (RILEY et al., 1983). A denominação de EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) foi adotada devido às características dos sintomas clínicos causadas nos indivíduos afetados. Em 1983, O'Brien e colaboradores relataram que *Escherichia coli* do sorotipo O157:H7 era responsável por um surto de colite hemorrágica nos EUA e que estes microrganismos produziam uma toxina similar à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Karmali et al. (1985) mostraram que estirpes de *Escherichia coli* produtoras da toxina de Shiga estavam epidemiologicamente associadas a casos de SHU. No mesmo ano, Park et al. (1999), demonstraram que os genes que codificam a toxina de Shiga em *Escherichia coli* eram carreados em bacteriófagos.

Atualmente a denominação STEC é utilizada para se referir a um grupo de *E. coli* que apresenta como característica em comum a produção da toxina de Shiga. Além da *Escherichia coli* O157:H7, outros sorotipos de STEC, conhecidos como STEC não-O157, também provocam doenças em humanos e são predominantes em vários países como

Alemanha, Japão, Estados Unidos e Austrália (BEUTIN et al., 1994; SCHMIDT; KARCH, 1996; BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 1998; BOERLIN et al., 1999; FEY et al., 2000; VAZ et al., 2004).

As STEC são similares às cepas não patogênicas de *Escherichia coli* quanto às propriedades bioquímicas e pertencem a diversos grupos sorológicos, causando dificuldades para o seu diagnóstico nos laboratórios de rotina. Somente as propriedades de virulência como a produção de toxina de Shiga, permite distinguir entre as estirpes de STEC e as *E. coli* comensais do intestino (TSCHAPE; FRUTH, 2001).

3 | EPIDEMIOLOGIA

As STEC são encontradas no intestino de animais sadios, sendo o principal reservatório o rebanho bovino e, também, no meio ambiente onde os animais são mantidos (FENG, 1995). Nos bovinos aparentemente os receptores Gb3 (globotriásilceramida) estão presentes apenas no cérebro e no rim, e a falta destes no intestino explicaria a ausência da doença intestinal nestes animais (PRUIMBOOM-BREES et al., 2000; CANPOLAT, 2015).

A excreção de STEC nos bovinos parece estar relacionada à alimentação do animal. A influência da dieta está baseada na habilidade da *E. coli* em desenvolver resistência ao pH ácido, aumentando o risco de doenças de origem alimentar no homem. O uso de ração rica em grãos na alimentação do gado é responsável por baixar o pH do cólon devido aos ácidos produzidos na fermentação. Nesses animais as STEC acabam adquirindo resistência aos ácidos além de serem encontradas em maior quantidade (DIEZ-GONZALEZ et al., 1998).

A acidez estomacal é considerada uma barreira à infecção pelos enteropatógenos, mas devido à adaptação ocorrida no rúmen do bovino, as STEC tornaram-se capazes de resistir a este mecanismo de defesa (CRAY et al., 1995). A resistência ao pH ácido do estômago também é uma característica importante para a virulência das STEC, pois permite que estes organismos sejam capazes de desencadear doença mesmo quando presentes em baixo número no alimento contaminado (PATON; PATON, 1998 b).

Embora o bovino seja considerado o principal reservatório das STEC, estirpes desta bactéria têm sido isoladas de vários animais domésticos e selvagens (HANCOCK et al., 1998). Os casos de infecção por STEC estão associados com a ingestão de carne mal cozida, leite não pasteurizado e derivados contaminados. A associação com alimentos industrializados sugere que os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos eventualmente acabam contribuindo para a disseminação da bactéria, como ocorre na produção em massa de hambúrgueres, sucos e outros alimentos, onde pequenas quantidades de alimentos contendo STEC acabam contaminando porções maiores do produto final (BERKELMAN, 1997).

A transmissão das STEC pessoa a pessoa, facilitada pela baixa dose infectante (100 UFC), também tem sido documentada (FENG, 1995). A resistência das STEC às condições

desfavoráveis do meio e a baixa dose infectante, também são fatores que contribuem para a sua habilidade em causar doenças transmitidas por alimentos (DIEZ-GONZALEZ et al., 1998).

A capacidade das STEC de sobreviver por mais de dez meses no meio ambiente constitui outro risco de contaminação para o homem, pois a infecção pode se iniciar como uma baixa ingestão destes microrganismos (MOBLEY et al., 2004). A manipulação destes patógenos pelos profissionais nos laboratórios também tem sido relatada como uma outra via de contaminação por STEC (SPINA et al., 2005).

4 | INCIDÊNCIA DE INFECÇÕES CAUSADAS POR STEC

Em maio do ano de 2011 um surto de gastroenterite com diarreia sanguinolenta e SHU relacionadas com infecções ocasionadas por STEC sorotipo O104:H4 ocorreu na Alemanha. Um total de 4137 casos foram identificados pelo mundo em 2011, destes, 896 desenvolveram SHU, com 33 mortes e os outros 3.241 apresentaram unicamente gastroenterite. A Alemanha notifica cerca de 65 casos de SHU anualmente, com incidência de 0,1 caso por 100.000 habitantes (MIKO et al., 2014).

No Reino Unido o sorogrupo O157 é o mais prevalente. Anualmente, na Inglaterra, são registrados cerca de 900 casos de STEC, sendo que a SHU é reconhecida como a principal causa de insuficiência renal aguda em crianças e idosos, ocasionando inúmeras mortes a cada ano (BYRNE et al., 2015).

No Japão, aproximadamente 4.000 casos de EHEC são notificados anualmente. O sorogrupo O157 é o mais prevalente dentre as infecções do trato gastrintestinal ocasionadas por EHEC. Este sorogrupo é também responsável por cerca de 90% dos casos de SHU ocorridos no país (WATAHIKI et al., 2014).

No Canadá, o maior surto descrito foi notificado em 1991 entre os esquimós com 521 casos, sendo 22 casos de SHU com duas mortes (SPIKA, 1998).

Durante o verão de 1995 foi descrito o primeiro surto causado por STEC na Austrália, no qual o sorotipo O111:H- foi implicado. Cerca de 200 pessoas foram afetadas, apresentando diarreia ou colite hemorrágica, 22 crianças desenvolveram SHU e 4 adultos foram diagnosticados com PTT. A fonte de contaminação foi uma salsicha preparada com carne bovina (PATON et al., 1996; ROBINS-BROWNE et al., 1998). Sorotipos de STEC não-O157 tais como O111:H- e O113:H21 são os mais frequentemente isolados na Austrália (BETTELHEIM, 2001; HORNITZKY et al., 2002).

As doenças veiculadas por alimentos afetam um em cada cinco americanos a cada ano. De 2005 a 2013 a taxa de infecção por STEC O157 variou entre 0,95 a 1,30 casos por 100.000 habitantes nos Estados Unidos (CDC, 2014).

Na América latina as doenças diarreicas são responsáveis por cerca de 10% das mortes na infância. As amostras de STEC estão entre as principais causas bacterianas da

diarreia nesta faixa etária (LOZER et al., 2013).

Na Argentina, a SHU é endêmica, com aproximadamente 400 novos casos por ano. A doença é líder em insuficiência renal aguda em crianças e a segunda causa de insuficiência renal crônica nesta mesma faixa etária. Na década passada, foi estimada uma taxa de 10 a 17 casos por 100.000 crianças abaixo de 5 anos de idade, média esta 10 vezes maior que a observada em países desenvolvidos. (LUIS et al., 2014).

No Brasil, os estudos sobre STEC ainda são incipientes. Cepas produtoras de toxina de Shiga foram isoladas de rebanho bovino aparentemente saudável (CERQUEIRA et al., 1999; SALES et al., 2006), com alta prevalência e aparentemente há predomínio de STEC não-O157 (CERQUEIRA et al., 1999; PIGATTO, 2003; IRINO et al., 2005).

5 | TOXINAS

Ensaios imunológicos de neutralização demonstraram que as toxinas de Shiga, principais marcadores de virulência de cepas de STEC, podem ser divididas em dois grupos antigênicos. O grupo um, Stx1, é neutralizado por anti-soro da citotoxina de *S. dysenteriae* 1, pois são consideradas idênticas (O'BRIEN et al., 1983). O grupo 2, Stx2, é neutralizável apenas por anti-Stx2 (O'BRIEN; HOLMES, 1987).

Os genes estruturais para Stx1 e Stx2 são encontrados em fagos lambda temperados, porém os genes para Stx2 já foram encontrados em cromossomos e apresentam 55 e 57% das sequências genéticas de suas subunidades A e B idênticas, respectivamente (JACKSON et al., 1987).

Stx1 é considerada altamente conservada e suas variantes apresentam poucas diferenças nas suas sequências genéticas, sem maiores consequências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998; DUFFY et al., 2001; THORPE et al., 2002). No entanto, algumas variantes de Stx1 foram descritas: Stx1c e Stx1OX3 encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de humanos e ovinos (KOCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002) e Stx1d, de amostras bovinas (BLANCO et al., 2004). Cinco variantes biológicas de Stx2 foram descritas, as quais diferem umas das outras por sua antigenicidade, toxicidade e sequência genética: Stx2, Stx2c, Stx2d e Stx2f (anteriormente denominada Stx2ev) isoladas de humanos e Stx2e, isolada de suínos (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998; DUFFY et al., 2001; THORPE et al., 2002).

Stx1 e Stx2 apresentam outras diferenças entre si, como a afinidade pelo receptor em comum, Gb3, e os mecanismos de regulação da expressão: Stx1 possui uma afinidade cerca de 10 vezes maior por Gb3, se comparado a Stx2 (HEAD et al., 1991). No entanto, estudos mais recentes revelaram uma velocidade de dissociação menor entre Gb3 e Stx2 do que Stx1. Assim, tanto a ligação quanto a dissociação entre o receptor e Stx2 parece ocorrer de forma mais lenta. Estas características podem explicar a maior associação entre Stx2 e danos vasculares, quando este é comparado a Stx1 (NAKAJIMA et al., 2001).

A estrutura A-B da família das toxinas de Shiga, holotoxinas de aproximadamente 70kDa, é conservada entre seus membros. A subunidade A, de 32kDa, pode ser clivada proteoliticamente, resultando em dois peptídios: A1 e A2, de 28 e 4kDa, respectivamente, e que permanecem ligados por uma ligação dissulfeto. O peptídio A1 apresenta atividade enzimática (Nglicosidase), enquanto A2 tem a função de ligar a subunidade A ao pentâmero formado por cinco subunidades B idênticas, de 7,7kDa cada. O pentâmero B liga a toxina ao receptor glicolipídico específico, presente na superfície da célula eucariótica, globotriasilceramida (Gb3) para Stx1 e Stx2 e globotetrasilceramida (Gb4) para Stx2e. Após a ligação, a holotoxina sofre endocitose por meio de depressões da membrana citoplasmática da célula eucariótica revestidas pela proteína clatrina (*coated pits*), formando uma vesícula selada com a holotoxina em seu interior. No citoplasma, esta vesícula pode se fundir com lisossomos, resultando na degradação da toxina. Porém, em células eucarióticas sensíveis a Stx, as vesículas são transportadas até o retículo endoplasmático via complexo de Golgi, alcançando, então, o citosol. Durante este processo, a subunidade A é clivada pela enzima furina, gerando o fragmento cataliticamente ativo, A1 e o fragmento A2, cuja ligação dissulfeto é posteriormente reduzida. O fragmento A1 livre tem atividade RNA N-glicosidase, e interage com a unidade 60S do ribossomo. Ao remover um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA eucariótico, A1 livre impede a ligação do amino-acil-RNA transportador a esta subunidade, e inibe a etapa de elongamento da síntese protéica e, assim, causa a morte celular (PATON; PATON, 1998a).

A toxina de Shiga, assim como a toxina colérica, não é capaz de formar poros e alcançar o citosol da célula-alvo. As Stxs são produzidas no cólon e, através da corrente sanguínea, são levadas aos rins, causando danos ao endotélio vascular e oclusão dos microvasos, através de uma combinação de toxicidade direta e indução local da inflamação os quais podem levar à SHU (ANDREOLI et al., 2002; CANPOLAT, 2015) conforme o quadro abaixo adaptado de Canpolat (2015):

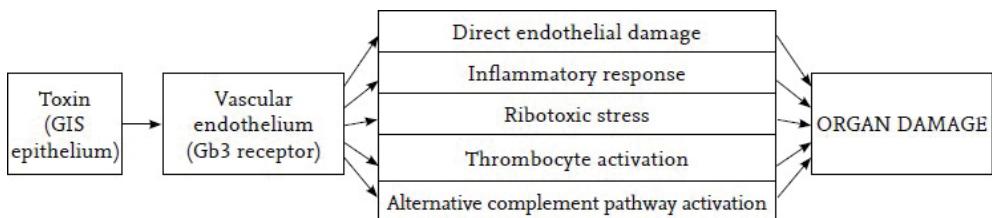


Figura 2. Os efeitos das toxinas de Shiga na síndrome hemolítico-urêmica ocasionada por STEC. (GIS: sistema gastrintestinal, Gb3: globotriacilceramida). Adaptado de CANPOLAT, 2015.

Habib e Jackson (1993) descreveram os operons de Stxs: uma estrutura em comum, que consiste em uma única unidade transcrevional, codificando primeiro a subunidade A, seguida da subunidade B. A tradução da subunidade B ocorre de forma mais intensa do

que a subunidade A, devido, aparentemente, à maior afinidade do ribossomo ao seu local de ligação, rbs (*ribosome binding site*), satisfazendo a relação estequiométrica A1:B5 da holotoxina.

Uma nova citotoxina chamada subtilase (SubAB) pode contribuir para o aumento da virulência de amostras de STEC em humanos (PATON et al., 2004). Foi sugerido previamente que esta toxina pode aumentar os efeitos das toxinas de Shiga (PATON; PATON, 2010). A SubAB foi descrita pela primeira vez em um surto de SHU de amostras de STEC O113:H21 na Austrália (PATON et al., 2004).

Foi demonstrado que a SubAB é tóxica para células Vero e letal para camundongos, causando extensa trombose microvascular e necrose no cérebro, rins e fígado (PATON et al., 2004; MORINAGA et al., 2007). A citotoxicidade dessa toxina perante células eucarióticas é devida a uma clivagem específica da chaperona BiP/GRP78 que é um reguladora da função do retículo endoplasmático (PATON et al., 2006).

6 | ADESÃO

O primeiro estágio para que as linhagens de *E. coli* iniciem um processo infeccioso é a adesão. Isto invoca uma estratégia das bactérias fixarem nas células do hospedeiro e expressarem outras propriedades relacionadas à sua patogenicidade. A capacidade de aderir de maneira firme é mediada por organelas de superfície bacteriana, denominada adesinas ou fatores de colonização, que podem ser classificadas, de maneira geral, em estruturas protéicas ou exopolissacarídicas, nas quais permite a liberação de toxinas para o interior da célula do hospedeiro e/ou a invasão desta, sendo o passo inicial na patogenicidade de *E. coli* diarréogênica (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005).

As adesinas de natureza polissacarídica compreendem cápsulas bacterianas, capazes de promover adesão inespecífica às células e outras superfícies. Há também estruturas fimbriais, que são estruturas protéicas filamentosas que podem apresentar ligação específica e inespecífica. Dentre as diversas que a *E. coli* diarréogênica pode apresentar, dois tipos são consideradas: fímbria tipo 1 e a fímbria curli. A fímbria tipo 1 tem a capacidade de aglutinar eritrócitos e aderir a uma grande variedade de células (DYER et al., 2007).

A fímbria curli é uma adesina produzida por algumas linhagens do gênero da *Escherichia* e *Salmonella*, que se liga a proteínas do hospedeiro e ativa mediadores inflamatórios. Ela tem o papel na autoagregação bacteriana e na formação de biofilme. Estudos argumentam que as linhagens portadoras desta estrutura são, geralmente, mais invasoras, o que contribuiria para sepse bacteriana (UHLICH, COOKE; SOLOMON, 2006).

Ainda em relação à fímbria curli, sua estrutura consiste em uma proteína constituída por 2 subunidades (CsgA e CsgB), que tem alta afinidade com o corante vermelho-congo. A diferenciação entre bactérias que expressam curli e as que não a expressam se dá

pela coloração neste indicador, onde as bactérias que expressam curli formam colônias avermelhadas, enquanto as que não a expressam, deixam o meio opaco, sem cor (OLSÉN et al., 2002). Foi observada que a expressão de curli se dá de forma mais intensa em temperatura abaixo de 30°C, em meio com baixa osmolaridade e pobre em nutrientes, durante a fase estacionária de crescimento (OLSÉN et al., 1993). Essas condições são observadas fora do hospedeiro (BEN NASR et al., 1996).

7 | ADESINAS

Em EHEC, assim como em EPEC, outros fatores de virulência estão localizados cromossomalmente em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E (*attaching and effacing*). Essa lesão é caracterizada pela degeneração localizada das microvilosidades epiteliais intestinais e a montagem de estruturas semelhantes a pedestais, constituídas de filamentos de actina, formadas nos locais onde há bactérias aderidas (NATARO; KAPER, 1998).

Os genes da região LEE codificam uma adesina não fimbrial de 94 kDa, a intimina (*eae*); um sistema de secreção do tipo III (proteínas Esc e Sep); chaperoninas (proteínas Ces); proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e proteínas efetoras (EspF, EspG e Map), assim como o receptor para intimina (Tir). A função das janelas abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs) ainda é desconhecida. (GIRARD et al., 2005).

A intimina é fator-chave de colonização para EHEC em ovinos (CORNICK et al., 2002) e bovinos recém-nascidos e adultos (DEAN-NYSTROM et al., 1998), e parece ser a única adesina de *E. coli* O157:H7 cujo papel na colonização do epitélio intestinal foi demonstrado em modelos animais (DONNENBERG et al., 1993; MCKEE et al., 1995). No entanto, mutantes intimina-negativos ainda são capazes de colonizar certos locais do trato gastrintestinal dos ruminantes, e isso indica que outros fatores de colonização podem estar presentes (VAN DIEMEN et al., 2005). Em humanos, STEC *eae*-positivos estão relacionados a quadros severos de diarreia, principalmente CH e SHU (KARMALI et al., 1985; PATON; PATON, 1998a). A região 5' do gene *eae* é conservada, enquanto a região 3' é heterogênea. Esta observação tornou possível a confecção de iniciadores universais e alelo-específicos para o ensaio de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), permitindo, assim, a diferenciação de 15 variantes de *eae*, que codificam 15 diferentes tipos e subtipos de intimina: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2/θ , δ/κ , ε , ζ , η , ι , λ , μ , ν , e ξ (BLANCO et al., 2004).

A análise da sequência genômica de duas cepas protótipos do sorotipo O157:H7 indicou a existência de, no mínimo, 12 regiões que codificam sequências homólogas a adesinas (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001). Uma dessas regiões contém genes relacionados ao operon *lpf* (fímbria polar longa) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (PERNA et al., 2001). A introdução do operon EHEC *lpf* em *E. coli* K-12 resultou em um

aumento da expressão de fímbrias e da adesão a células em cultivo (TORRES et al., 2002). A subunidade principal de LPF, *lpfA*, foi detectada em cepas de EHEC dos sorogrupo O157 e O145 (SZALO et al., 2002).

Dentre as adesinas não-fimbriais, estão incluídas as adesinas Efa1 (Fator de aderência de EHEC) (NICHOLLS et al., 2000; STEVENS et al., 2002), Iha (adesina homóloga a IrgA de *Vibrio cholerae*) (TARR et al., 2000), Cah (homólogo ao antígeno 43 ligante de cálcio) (TORRES et al., 2002) e OmpA (proteína de membrana externa A).

Algumas cepas de STEC não possuem a região LEE, portanto esta ausência na expressão de intimina indica que outras adesinas devem estar envolvidas na adesão às células hospedeiras (TORRES; KAPER, 2003).

A adesina Saa (adesina auto-aglutinante de STEC) foi descrita em uma cepa de STEC do sorotipo O113:H21. Saa é uma proteína de membrana externa, associada ao aumento da adesão às células HEp-2 quando expressa como uma proteína recombinante em *E. coli* (PATON et al., 2001). Estudos recentes indicaram que cepas *saa*-positivas são mais frequentemente encontradas em STEC isolados de bovinos do que de humanos, sugerindo um papel importante desta adesina na colonização intestinal desses animais (JENKINS et al., 2003).

A fímbria LPF também foi caracterizada em cepas STEC O113:H21 e o gene *lpfAO113* foi detectado em diversas cepas de *E. coli* isoladas de humanos e animais. Esta fímbria pode ser essencial no processo inicial de adesão, realizando a ancoragem bacteriana ao enterócito (OSEK et al., 2003).

OBJETIVOS

1 | OBJETIVO GERAL

- Caracterizar em nível fenotípico e molecular as propriedades de adesão e citotoxicidade de isolados de origem fecal bovina de *Escherichia coli* produtoras das toxinas de Shiga (STEC) em células eucarióticas.

2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença dos genes de toxinas de Shiga e subtilase A;
- Verificar a capacidade de adesão dos isolados às células de cultura de tecido (HEp-2 e HeLa);
- Analisar as propriedades relacionadas com a adesão, incluindo a capacidade de hemaglutinação manose-resistente, produção de biofilme, ensaio Vermelho-Congo para expressão de fímbria curli e hidrofobicidade da superfície celular;
- Verificar a presença de genes que codificam as principais adesinas de STEC;
- Correlacionar as propriedades de adesão com a presença dos genes de adesinas e com a capacidade de adesão às células eucarióticas;

MATERIAL E MÉTODOS

1 | ISOLADOS BACTERIANOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade CEUMA inicialmente com 56 amostras de *Escherichia coli* pertencentes à bacterioteca local que foram previamente isoladas de fezes bovinas de rebanho apto para o abate, coletadas no interior do Estado do Maranhão (SALES, 2006). As amostras foram mantidas a -20°C em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol.

2 | REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA A VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES *STX1*, *STX2* E *EAEA*

A partir do crescimento em ágar nutritivo, os isolados presentes em uma única colônia foram raspados e homogeneizados em microtubos com 500 µl de água destilada estéril, submetidas à temperatura de 100°C durante 10 minutos e depois os eppendorfs foram armazenados à temperatura de -20 °C (GIOFFRE et al., 2002). O DNA bacteriano foi utilizado como molde nas reações de amplificação e caracterização dos genes em estudo, utilizando-se pares de iniciadores. A análise da PCR foi realizada utilizando-se uma técnica por PCR *multiplex* para a pesquisa dos genes: *stx1*, *stx2* e *eaeA* (PATON; PATON, 1998) (Tabela 1). As reações de amplificação foram feitas segundo o protocolo de Sales et al. (2006) utilizando-se 2 µl do DNA molde, 1U da enzima *Taq* polimerase, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl (GibcoBRL – Invitrogen/Brasil) e água MilliQ, para um volume final de 50 µl. As condições de amplificação foram modificadas do protocolo original (PATON; PATON, 1998) e incluíram os seguintes ciclos de amplificação: 95° C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos de 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 95° C/1min; anelamento a 60° C/1min 30s e amplificação a 72° C/1min. No final foi incluída uma etapa de extensão adicional a 72° C/10 min. Como controle positivo foi utilizada a estirpe de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) EDL933 positiva para os genes *stx1*, *stx2* e *eaeA* e como controle negativo foi utilizada a estirpe de *E. coli* K12 DH5a. Os produtos da amplificação foram detectados mediante análise electroforética em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. O gel foi examinado usando-se um transiluminador de luz ultravioleta para a visualização dos padrões de bandas referentes aos genes pesquisados e então fotografados.

Primers	Sequência (5' - 3')	Produto amplificado(pb)
Stx1 F	ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC	
		180
Stx1 R	AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	
Stx2 F	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	
		255
Stx2 R	TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	
EaeA F	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	
		384
EaeA R	CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	

Tabela 1. Iniciadores utilizados para Reação em Cadeia pela Polimerase *multiplex* para pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eaeA*

Fonte: Paton e Paton (1998a)

3 I ADESÃO BACTERIANA ÀS CÉLULAS HEla E HEp-2

3.1 Cultivo e preparo das monocamadas celulares

As células HeLa foram descongeladas em banho-maria a 37° C e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo meio MEM (meio mínimo essencial de Eagle modificado / Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB / Cultilab) e 1% de solução de antibióticos contendo penicilina (1000 U /mL; Sigma) e estreptomicina (250 µg / mL; Sigma). Os frascos de cultura foram incubados em atmosfera de 5% de CO₂ e 37°C, por 48 h, até a formação do tapete celular. Após este período, o meio foi descartado, sendo adicionada à cultura celular uma solução de ATV (Associação Tripsina-Versene / Cultilab) para o deslocamento do tapete. As células foram ressuspensas no meio MEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos, para um número estimado de 2,5 x 10⁵ células / mL. A suspensão de células foi distribuída em microplacas de 24 cavidades, contendo lamínulas, em volumes de 1mL por cavidade. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 h ou até que a monocamada atingisse a semi-confluência.

3.2 Teste de adesão às células HeLa e HEp-2

Um inóculo de 40µL das amostras de *E. coli* cultivadas em TSB (caldo tripticaseína de soja) por 18h a 37°C em agitação de 150 rotações por minuto (RPM) foi adicionado em placas de 24 orifícios, contendo monocamadas celulares semi-confluentes de células HeLa contidas em MEM acrescido de SFB a 2% na ausência ou presença de D-manose a

2%. Após 2h de incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ (período de infecção), as placas foram lavadas com PBS e adicionado ao meio 1mL de MEM acrescido de SFB com e sem manose. Após 2h (período de multiplicação), cada uma das placas foi lavada com PBS (tampão fosfato-salino) e as células fixadas com metanol por um período mínimo de 10 minutos. As preparações foram coradas com May-Grunwald / Giemsa e analisadas em microscópio óptico (Nikon). Foram consideradas amostras aderentes quando se detectava pelo menos 10 bactérias aderidas em uma determinada localidade da célula (WIELER et al., 1998).

4 | ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-SENSÍVEL E MANOSE-RESISTENTE

As amostras foram examinadas quanto à presença de hemaglutininas sensíveis ou resistentes à manose pela técnica de aglutinação em lâmina às hemácias de carneiro, na ausência e na presença de D-manoose a 1%, como o descrito por Evans et al. (1981).

Os isolados foram previamente semeados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas para que, posteriormente, fossem utilizadas no teste de hemaglutinação. Para realização do teste foi colocado em uma lâmina: 20 µL da hemácia humana a 3% em PBS, 20 µL da suspensão bacteriana previamente crescida em caldo BHI e 20 µL de PBS com 1% de manose. Com auxílio de um palito de madeira estéril as soluções foram misturadas e agitadas manualmente por aproximadamente 60 segundos. As cepas de *E.coli* que aglutinaram os eritrócitos humanos na presença de manose foram denominadas de manose-resistente (MRHA), no entanto as amostras de *E.coli* que não aglutinaram os eritrócitos na presença de manose foram denominadas de manose-sensível (MSHA).

5 | IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FÍMBRIA CURLI

As bactérias foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB) com ph 8, a 37°C, por 24 horas. Posteriormente, as culturas foram semeadas em placas de ágar Luria- Bertani (LB) sem sal, contendo 0.004% de Vermelho Congo e 0.002% de Azul Brilhante. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas em temperatura ambiente. Colônias vermelhas ou rosas indicavam a expressão de curli (DA RE; GHIGO, 2006).

6 | DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA

Foi realizada através dos cultivos em BHI, 24 horas após a inoculação a 37°C. Os mesmos foram padronizados por espectrofotometria, deixando-se todos com densidade óptica (Do) igual a 0,7. Logo após, uma porção de cada cultivo foi diluída à 1:40 em meio BHI. Cada amostra foi adicionada em microplacas com 96 poços com fundo em U, em volume de 200 µL/cavidade. Após preenchidas, as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas em estufa. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas por três vezes com

tampão PBS e deixadas à temperatura ambiente. Os testes foram realizados em triplicata. Foi adicionado às placas 200 μ L/cavidade de Cristal Violeta, que foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após, cada poço foi lavado com água destilada por três vezes, e deixadas secar em temperatura ambiente. As placas coradas com cristal violeta foram submetidas a espectrofotometria com filtro de 540nm para aferir as respectivas absorbâncias de cada poço. Baseando-se nas densidades ópticas (D.o.) produzidas pelos isolados (D.o.i) e tomando-se por base o controle negativo (D.o.c) os isolados foram classificados nas seguintes categorias (STEPANOVIC' et al., 2004):

Não produtor: D.o.i < D.o.c

Produtor fraco: D.o.c < D.o.i

Produtor moderado: (2x D.o.c) < D.o.i \leq (4 X D.o.c)

Produtor forte: (4 X D.o.c) < D.o.i

7 | DETERMINAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DE SUPERFÍCIE CELULAR

Após crescimento em BHI ágar por 24h a 37°C, as culturas foram suspensas em concentrações crescentes de sulfato de amônio (NH₃)₂SO₄, de 0,5M, 1,0M, 1,5M, 2,0M, 2,5M e 3,0M. A formação de grumos em até dois minutos após a suspensão indicou resultado positivo, foi considerado hidrofóbico o isolado que formou grumos em concentrações de sulfato de amônio inferiores a 2M (SCHMIDT et al., 1998; KREPSKY et al., 2003).

8 | PESQUISA DOS GENES DE ADESINAS SAA, IHA, EFA1, LPFAO113, EHA A E DA CITOTOXINA SUBA

A pesquisa dos genes de virulência referentes às adesinas Saa, Iha, Efa1, LpfAO113 e EhaA, bem como da citotoxina SubA, foram realizadas com os iniciadores e condições descritas na Tabela 2. As concentrações empregadas foram as seguintes para cada amostra: iniciador (2,5 μ L), Go Taq Green Master Mix (12,5 μ L), DNA molde (2,5 μ L) e H₂O (5 μ L), totalizando o volume total de 25 μ L.

Como controle positivo para os genes *iha*, *efa1*, *ehaA*, *saa*, *lpfAO113* e *subA* foi utilizada uma amostra de EHEC O157:H7. Como controle negativo para todos os genes foi utilizada a *E. coli* DH5a. Os produtos da amplificação foram detectados mediante análise electroforética em gel de agarose a 1,5% (Iha, Efa1, LpfAO113, EhaA) e gel de agarose a 0,8% (Saa e SubA), ambos corados com brometo de etídio. O gel foi examinado usando-se um transiluminador de luz ultravioleta para a visualização dos padrões de bandas referentes aos genes pesquisados e então fotografados (WU et al., 2010).

Primer	Sequência (5'-3')	Condições de Amplificação			Amplicon (bp)	Referência
		Desnaturação	Anelamento	Extensão		
saa-11	ACCTTCATGGCAACGAG	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 90 s	1.504	WU et al., 2010
saa-22	AATGGACATGCCTGTGG					
iha-u	GAAATCAGCATCCGAGG	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	410	WU et al., 2010
iha-d	ATACGCGTGGCTGCTG					
efa1-u	GTCAAAGGTGTTACAGAG	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	640	WU et al., 2010
efa1-d	ATTCCATCCATCAGGCC					
lpfAO113-u	ACTTGTGAAGTTACCTCC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	360	WU et al., 2010
lpfAO113-d	CGGTATAAGCAGAGTCG					
ehaA-u	AGGCATGAGACACGATC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	500	WU et al., 2010
ehaA-d	AAGTCGTGCCATTGAGC					
subAF	GTACGGACTAACAGGGAACTG					PATON e
subAR	ATCGTCATATGCACCTCCG	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	1.264	PATON, 2005

Tabela 2. Iniciadores das adesinas e citotoxina e condições da Reação em Cadeia pela Polimerase

9 | ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da distribuição da adesão em células eucarióticas e a relação entre a presença dos genes de adesinas nos isolados de STEC foi utilizado o teste do qui-quadrado de aderência. Para verificar as relações entre as propriedades de adesão e a capacidade de adesão nas células eucarióticas, dos genes de adesinas e a capacidade de adesão em células e as propriedades de adesão e a presença dos genes de adesinas, foram empregados o teste binomial. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. No processamento eletrônico dos dados, foi utilizado o software *BioEstat 5.0*.

RESULTADOS

1 | PESQUISA DOS GENES CODIFICADORES DE CITOTOXINAS

De uma coleção bacteriana constituída por 56 cepas de *E. coli* isoladas de bovinos, 21 (37,5%) foram caracterizadas como STEC, uma vez que apresentavam os genes das toxinas de Shiga (*stx1* e/ou *stx2*). No geral, o gene da citotoxina Stx1 foi detectado em nove isolados (42,9%), enquanto que o gene que codifica a citotoxina Stx2 foi evidenciado em 17 isolados (81%), sendo o gene de toxina mais presente dentre os isolados. Destes, foi observado que cinco isolados (23,8%) possuíam os genes *stx1* e *stx2* simultaneamente; 12 isolados (57,1%) possuíam unicamente o gene *stx2* e quatro isolados (19%) albergavam apenas *stx1*.

Além desses genes, foi pesquisado também o gene *subA* que codifica a citotoxina subtilase A. Dos 21 isolados, 15 (71,4%) foram positivos para esse gene. Por outro lado, cinco isolados (AN 31, AN 74.1, AN 74.3, AN 75 e AN 88) apresentaram os genes para as três citotoxinas (Tabela 3).

Isolado	Genes de citotoxinas		
	<i>stx1</i> (180 bp)	<i>stx2</i> (255 bp)	<i>subA</i> (1264 bp)
AN 15.1	+	-	-
AN 15.2	+	-	-
AN 30	-	+	+
AN 31	+	+	+
AN 33	-	+	+
AN 41	-	+	+
AN 49	-	+	+
AN 50	-	+	-
AN 51.1	+	-	+
AN 60	-	+	-
AN 62	+	-	+
AN 73	-	+	+
AN 74.1	+	+	+
AN 74.3	+	+	+
AN 75	+	+	+

AN 78	-	+	-
AN 81	-	+	-
AN 85	-	+	+
AN 88	+	+	+
AN 94	-	+	+
AN 97	-	+	+
<hr/>			
n (%)	9 (42,9)	17 (81)	15 (71,4)

Tabela 3. Caracterização molecular dos 21 isolados de STEC de origem bovina

2 | ADESÃO ÀS CÉLULAS HUMANAS

Os resultados dos testes de adesão às linhagens celulares HEp-2 e HeLa evidenciaram que esta adesão ocorreu em ambas as células pesquisadas, sendo mais evidenciada nas células HEp-2, com 19 isolados (90,5%). A adesão em células HeLa foi constatada em 14 isolados (66,7%), sendo que destes, 13 também aderiram em células HEp-2, o único isolado que aderiu em células HeLa e não aderiu em células HEp-2 foi o isolado AN 15.2 (Tabela 4). A análise comparativa da adesão nas células indicou uma diferença significativa, pois as cepas de STEC aderiram predominantemente em células HEp-2 ($p < 0,05$).

Na análise da adesão nas duas linhagens celulares, foi verificada uma distribuição heterogênea ($p = 0,0043$), pois seis isolados (28,6%) aderiram-se somente em células HEp-2, um isolado (4,8%) aderiu somente em células HeLa, 13 isolados (61,9%) aderiram em ambas as linhagens celulares e apenas uma amostra não se mostrou aderente a nenhuma das duas células eucarióticas analisadas (Tabela 5). A figura 1 mostra a interação dos isolados de STEC em células HeLa.

Capacidade de adesão

Isolado	HEp-2	HeLa
AN 15.1	-	-
AN 15.2	-	+
AN 30	+	+
AN 31	+	-
AN 33	+	+
AN 41	+	+
AN 49	+	+
AN 50	+	-
AN 51.1	+	+
AN 60	+	+
AN 62	+	+
AN 73	+	+
AN 74.1	+	+
AN 74.3	+	-
AN 75	+	-
AN 78	+	+
AN 81	+	+
AN 85	+	+
AN 88	+	-
AN 94	+	+
AN 97	+	-
n (%)	19 (90,5)	14 (66,7)

p < 0,05 – análise comparativa da adesão em células HEp-2 e HeLa.

Tabela 4. Capacidade de adesão dos isolados de STEC de origem bovina às células eucarióticas (HEp-2 e HeLa)

Perfil de adesão	nº positivos	(%)
Aderentes	20	(95,2)
Em HEp-2/HeLa	13	(61,9)
Apenas em HEp-2	6	(28,6)
Apenas em HeLa	1	(4,8)
Não aderente	1	(4,8)

(p = 0,0043) Teste qui-quadrado de aderência

Tabela 5. Perfil da adesão bacteriana de isolados de STEC de origem bovina em duas diferentes linhagens celulares

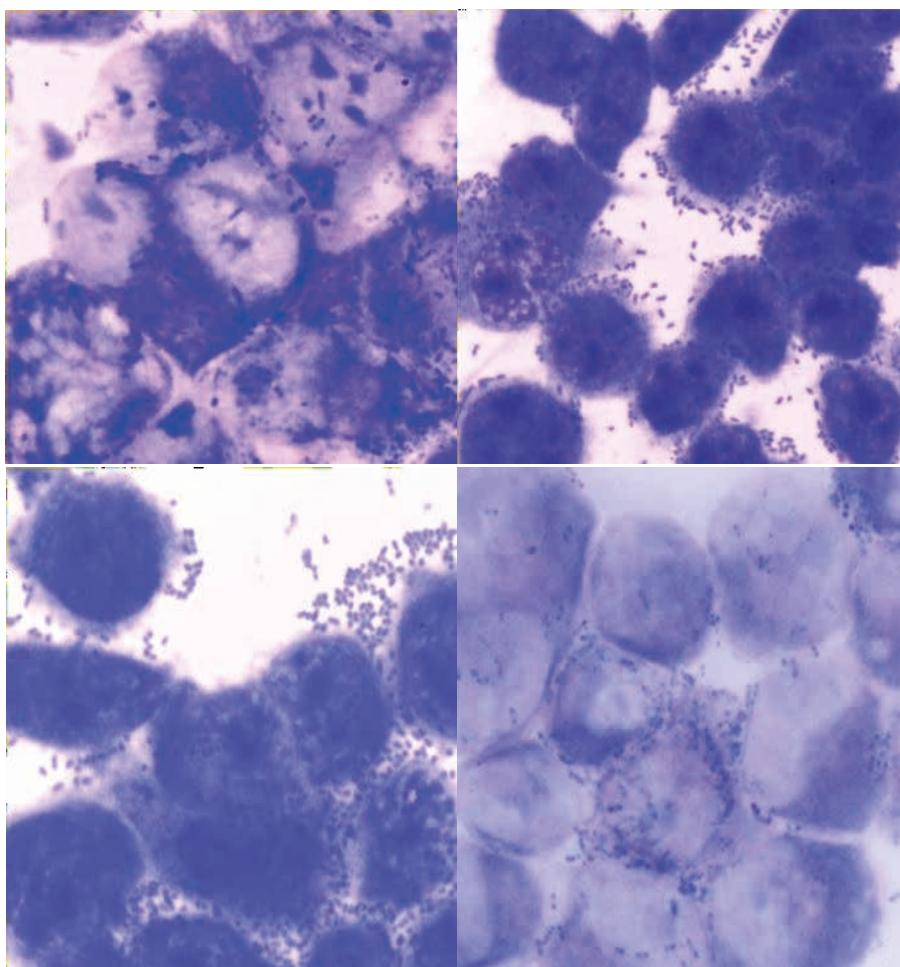


Figura 3. Adesão de isolados de STEC em células HeLa, após coloração pelo panótico (aumento de 1000x).

3 | PESQUISA DAS PROPRIEDADES RELACIONADAS COM A ADESÃO

Com o intuito de se verificar se haviam propriedades relacionadas à capacidade de adesão destes isolados bacterianos, foi investigada a capacidade de hemaglutinação manose-resistente, a expressão da fímbria curli, a formação de biofilme e a hidrofobicidade da superfície bacteriana. Na Tabela 6 está demonstrado que os isolados de STEC usualmente apresentavam adesinas manose-resistentes, uma vez que todos foram MRHA-positivos. Além disso, a maioria dos isolados apresentava superfície hidrofóbica (85,7%) e produzia biofilme (76,2%).

Isolado	Produção de biofilme ^a	MRHA	Expressão de fímbrias curli	Hidrofobicidade ^b
AN 15.1	-	+	-	+
AN 15.2	+	+	-	+
AN 30	+	+	-	+
AN 31	+	+	-	+
AN 33	+	+	-	+
AN 41	+	+	-	+
AN 49	-	+	-	+
AN 50	+	+	+	+
AN 51.1	+	+	-	+
AN 60	-	+	-	-
AN 62	-	+	-	-
AN 73	+	+	+	+
AN 74.1	+	+	-	-
AN 74.3	+	+	+	+
AN 75	+	+	+	+
AN 78	+	+	-	+
AN 81	-	+	+	+
AN 85	+	+	-	+
AN 88	+	+	-	+
AN 94	+	+	+	+
AN 97	+	+	+	+
n (%)	16 (76,2)	21 (100)	7 (33,3)	18 (85,7)

^a As amostras consideradas positivas, mostraram-se fracas produtoras de biofilme.

^b As amostras consideradas positivas foram as que precipitaram em concentrações de $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ inferiores a 2M.

Tabela 6. Propriedades relacionadas com a adesão nos isolados de STEC de origem bovina

4 | PESQUISA DOS GENES DE ADESINAS

Com o objetivo de se esclarecer os mecanismos de adesão dos isolados de STEC, foram pesquisados, através de PCR, seis genes que codificam as seguintes adesinas: intimina, Saa, Iha, LpfAO113, EhaA e Efa1.

O gene *eaeA* que codifica a intimina foi detectado unicamente em dois isolados (AN 15.2 e AN 31), já o gene que codifica a adesina Saa (adesina auto-aglutinante de STEC) foi detectado em sete amostras (33,33%), sendo que as únicas duas amostras que possuem o gene *eaeA* também possuem o gene *saa*. O gene que codifica a adesina Iha foi observado em cinco amostras (23,8%). O gene que codifica a adesina LpfAO113 estava presente em 13 amostras (61,9%). Já o gene que codifica a adesina ehaA (autotransportadora de EHEC) foi o mais frequente entre todos, observando-se em 17 isolados (81%). O gene que codifica a adesina Efa1 (Fator de aderência de *E. coli*) foi pesquisado, porém não foi detectado em nenhum isolado.

Pode-se verificar na Tabela 7 que nenhum isolado apresentava os cinco genes, porém os isolados AN 31, AN 51.1 e AN 74.1 apresentaram genes para quatro diferentes adesinas. Observou-se que a distribuição dos mesmos foi bastante heterogênea entre as amostras ($p=0,002$), uma vez que dois isolados apresentaram *eaeA*, enquanto 17 isolados possuíam *ehaA*, evidenciando a grande variabilidade genética entre os isolados estudados.

Isolado	<i>eaeA</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>LpfAO113</i>	<i>ehaA</i>
AN15.1	-	+	+	-	+
AN 15.2	+	+	-	-	+
AN 30	-	-	-	+	+
AN 31	+	+	-	+	+
AN 33	-	-	-	-	-
AN 41	-	-	+	+	+
AN 49	-	+	-	-	+
AN 50	-	-	-	+	+
AN 51.1	-	+	+	+	+
AN 60	-	-	-	+	+
AN 62	-	+	-	+	+
AN 73	-	-	-	+	-
AN 74.1	-	+	+	+	+
AN 74.3	-	-	-	+	+

AN 75	-	-	-	+	+
AN 78	-	-	-	-	+
AN 81	-	-	-	+	+
AN 85	-	-	-	-	-
AN 88	-	-	-	-	-
AN 94	-	-	+	+	+
AN 97	-	-	-	-	+
n (%)	2 (9,5)	7 (33,3)	5 (23,8)	13 (61,9)	17 (81)

º O gene *efal1* não foi detectado em nenhuma das 21 amostras.

(p = 0,002) Teste qui-quadrado de aderência

Tabela 7. Distribuição dos genes de adesinas dos isolados de STEC ^a

5 | RELAÇÃO ENTRE AS PROPRIEDADES DE ADESÃO E A CAPACIDADE DE ADESÃO ÀS CÉLULAS EUCARÍÓTICAS

A Tabela 8 mostra a relação entre as propriedades de adesão e a capacidade de adesão em células eucarióticas (HEp-2 e HeLa). Das 21 amostras positivas para MRHA, 19 isolados aderiram-se em células HEp-2 e 14 isolados aderiram em células HeLa. Observou-se também que todos os sete isolados que expressaram fimbria curli, aderiram em células HEp-2, porém apenas três isolados apresentaram adesão em células HeLa. No que diz respeito à produção de biofilme, dos 16 isolados positivos para esta propriedade de adesão, 15 aderiram às células HEp-2 e dez aderiram em células HeLa. Dentre os 18 isolados que apresentaram hidrofobicidade de superfície celular, 16 deles aderiram em células HEp-2 e apenas 11 aderiram em células HeLa. Foi observado ainda que todas as quatro propriedades estavam relacionadas e podem interferir no processo de adesão apenas às células HEp-2 (p < 0,05).

Propriedades de adesão	N	Adesão às células eucarióticas			
		Positivos em HEp-2		Positivos em HeLa	
		n (%)	p	n (%)	p
MRHA	21	19 (90,5)	0.0002	14 (66,7)	0.1892
Hidrofobicidade	18	16 (88,9)	0.0013	11 (61,1)	0.4807
Produção de biofilme	16	15 (94)	0.0005	10 (62,5)	0.4545
Expressão de curli	7	7 (100)	0.0156	3 (42,8)	0.706

Teste binomial

Tabela 8. Relação das propriedades de adesão e a capacidade de adesão em duas linhagens de células eucarióticas

6 | RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DOS GENES DE ADESINAS E A CAPACIDADE DE ADESÃO ÀS CÉLULAS EUCARÓTICAS

Buscando-se verificar a relação entre a presença das adesinas e a capacidade de adesão às células HEp-2 e HeLa foi constatado que dos dois isolados positivos para o gene *eaeA*, apenas um (50%) aderiu em células HEp-2 e o outro isolado aderiu em HeLa. Para a adesina *Saa*, a proporção da adesão se deu de forma semelhante nas duas linhagens celulares, com cinco isolados (71,4%), fato este que ocorreu também com a adesina *Iha*, que apresentou quatro isolados (80%) que provocaram adesão em ambas as células. A adesina *LpfAO113*, apresentou relação diferente entre as duas linhagens celulares, mostrando-se presente em todos os 13 isolados (100%) em células HEp-2 e em nove isolados (69,2%) em células HeLa. Dos 17 isolados positivos para adesina *ehaA*, 15 (88,2%) aderiram em células HEp-2 e 11 destes (64,7%) aderiram em células HeLa (Tabela 9).

Notou-se que nenhum gene de adesina esteve associado à adesão em células HeLa, porém, em se tratando de células HEp-2, as adesinas *LpfAO113* e *EhaA* podem ter contribuído significativamente para a adesão bacteriana nesta linhagem celular ($p = 0,0002$ e $p = 0,0023$, respectivamente).

Genes	N	Adesão às células eucarióticas			
		Positivos em HEp-2		Positivos em HeLa	
		n (%)	p	n (%)	p
<i>ehaA</i>	17	15 (88.2)	0.0023	11 (64.7)	0.3323
<i>lpfAO113</i>	13	13 (100.0)	0.0002	9 (69.2)	0.2668
<i>saa</i>	7	5 (71.4)	0.4531	5 (71.4)	0.4531
<i>iha</i>	5	4 (80.0)	0.3750	4 (80.0)	0.3750
<i>eaeA</i>	2	1 (50.0)	1.0000	1 (50.0)	1.0000

Teste binomial

Tabela 9. Relação dos genes de adesinas e a capacidade de adesão em duas linhagens de células eucarióticas

7 | RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DOS GENES DE ADESINAS E AS PROPRIEDADES DE ADESÃO

A Tabela 10 evidenciou a relação entre as propriedades de adesão e as adesinas existentes nos 21 isolados de STEC. Pode-se observar que a propriedade de adesão hemaglutinação manose-resistente foi influenciada pela presença de quatro genes de adesinas (*saa*, *iha*, *lpfAO113* e *ehaA*). Outra propriedade de adesão marcante, a formação de biofime, foi influenciada somente pela presença do gene *lpfAO113* ($p = 0,046$). Já a

hidrofobicidade foi influenciada pela presença dos genes *lpfAO113* ($p = 0,046$) e *ehaA* ($p = 0,006$).

O gene *lpfAO113* influenciou na expressão de três propriedades pesquisadas (hemaglutinação manose-resistente, produção de biofilme e hidrofobicidade), seguido pelo gene *ehaA* que interferiu positivamente na expressão da hemaglutinação manose-resistente e na hidrofobicidade.

Propriedades de adesão	Adesinas									
	eaeA	p	saa	p	iha	p	lpfAO113	p	ehaA	p
MRHA	2/2		7/7		5/5		13/13		17/17	
		0,250		0,008		0,031		< 0,001		< 0,001
	100%		100%		100%		100%		100%	
Produção de biofilme	2/2		4/7		4/5		10/13		12/17	
		0,250		0,353		0,188		0,046		0,072
	100%		57,1%		80%		76,9%		70,6%	
Hidrofobicidade	2/2		5/7		4/5		10/13		14/17	
		0,250		0,227		0,188		0,046		0,006
	100%		71,4%		80%		76,9%		82,4%	

Teste binomial

Tabela 10. Relação entre as propriedades de adesão e a presença dos genes de adesinas

DISCUSSÃO

A habilidade dos patógenos bacterianos de se ligarem à mucosa do hospedeiro é um passo crítico para o desencadeamento de inúmeras infecções bacterianas. Os isolados de STEC expressam uma ampla variedade de adesinas fimbriais e afimbriais que possibilitam a formação de biofilmes nas superfícies celulares e, consequentemente, tornam os ruminantes reservatórios persistentes de STEC (FARFAN, 2012).

O principal fator de virulência das STEC são as toxinas de Shiga, duas potentes citotoxinas (Stx1 e Stx2) que provocam inúmeros sintomas em pacientes infectados por STEC, podendo leva-los até a morte. Em ruminantes, a toxina de Shiga 1 (Stx1) desencadeia maior número de sintomas, sendo o principal deles a diarreia, muitas vezes sanguinolenta, enquanto que em humanos esses casos são mais observados com a presença da Stx2, que pode até evoluir para casos de síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica (PTT), principalmente em crianças e idosos (NATARO; KAPER, 1998).

Neste estudo foi constatado que as amostras de STEC isoladas de fezes de bovinos do Estado do Maranhão podem interagir com células humanas “*in vitro*” causando infecção, considerando a elevada frequência em que aderiram às células HEp-2 e HeLa e pelo seu potencial toxigênico.

Quanto a distribuição das toxinas de Shiga, o presente estudo apresentou resultados semelhantes ao realizado por Cookson et al. (2002) que analisaram 26 isolados de STEC e constataram a presença de 14 isolados (53,8%) que carreavam o gene *stx1*, 22 (84,6%) o gene *stx2* e 10 amostras (38,4%) possuíam ambos os genes (*stx1* e *stx2*).

A alta prevalência de isolados que carreavam unicamente o gene *stx2* (57,1%) é relevante, pois amostras *stx2*-positivas são potencialmente mais virulentas e mais frequentemente associadas com quadros de SHU em relação a outras albergando apenas o gene *stx1* ou ambos (SCHIMDT et al., 1995) (FRIEDRICH et al., 2002).

Outra citotoxina de extrema importância na patogenicidade das STEC é a subtilase A (SubA). O gene desta toxina mostrou prevalência significativa dentre os isolados deste estudo (71,4%). A distribuição deste gene apresenta-se de forma muito heterogênea na literatura. Neste estudo foi observada uma ligação entre a presença dos genes *subA* e *stx2*. Dos 15 isolados positivos para *subA*, apenas dois não possuíam *stx2*. Esses dados são semelhantes aos observados por Paton; Paton (2005) e Velandia et al. (2011).

Essa nova citotoxina, chamada subtilase, pode contribuir para o aumento da virulência de amostras de STEC em humanos (PATON et al., 2004). Foi sugerido previamente que esta toxina pode aumentar os efeitos das toxinas de Shiga (PATON; PATON, 2010). A citotoxina SubA foi identificada unicamente em amostras de STEC (PATON; PATON, 2005).

A SubA é tóxica para células Vero e letal para camundongos, causando extensa trombose microvascular e necrose no cérebro, rins e fígado (PATON et al., 2004)

(MORINAGA et al., 2007). A citotoxicidade dessa toxina perante células eucarióticas é devida a uma clivagem específica da chaperona BiP/GRP78 que é uma reguladora da função do retículo endoplasmático (PATON et al., 2006).

Quanto a associação entre os genes *subA* e *eaeA*, dos dois isolados positivos para *eaeA*, um possuía *subA* e outro não. Este resultado contrasta com alguns estudos que mostram que os genes *subAB* são identificados unicamente em amostras de STEC *eae*-negativas (PATON; PATON, 2005) (TOZZOLI et al., 2010). Entretanto, Newton et al. (2009) relataram uma amostra de STEC albergando tanto genes *subA* e *eae*.

Em relação à presença do gene *eaeA*, evidenciado em apenas 2 amostras (9,5%), a literatura mostra resultados diversos, como apresentado por Wu et al. (2010), onde o gene foi detectado em 58 (95%), dentre 61 isolados de pacientes diarreicos e em apenas 2 (1,2%), das 171 amostras de gado saudável. Enquanto Orden et al. (2011), em um estudo com 52 amostras isoladas de gado saudável e diarreico, observaram a presença de 14 amostras (27%) positivas para o gene *eae*.

O gene *eaeA* está envolvido com a expressão do fenótipo A/E, que provoca as lesões típicas das STEC e EPEC no enterócito. As lesões A/E envolvem mudanças estruturais, como a perda das microvilosidades e a ligação íntima da bactéria na superfície do enterócito. Beneficiando a adesão bacteriana, existe um acúmulo de componentes citoesqueléticos, resultando na formação de estruturas semelhantes a pedestais. Todos os genes necessários para a formação dessa lesão A/E estão localizados na ilha de patogeniada LEE, que alberga, dentre outros, o gene *eaeA*, que codifica para a proteína intimina que possibilita essa ligação próxima e eficaz entre a bactéria e o enterócito. Esse fenômeno é observado tanto em STEC, quanto em EPEC (PATON; PATON, 1998). Segundo Torres (2010) a proporção de detecção do gene *eaeA* tem predominado dentre as amostras provenientes de gado diarreico (43,8%) em relação ao gado saudável (19,4%).

O fator que pode explicar essa baixa prevalência do gene *eaeA* nas amostras estudadas, seria o fato de que em gado jovem o gene *eae* está presente em uma grande porcentagem das amostras, porém esse genótipo não é observado em animais adultos. Presumivelmente, as diferenças fisiológicas no ambiente intestinal entre gado amamentado e gado ruminante possuem um importante papel. Antes da ruminação, amostras *eae*-positivas parecem ter uma vantagem de colonização no trato intestinal. Após a ruminação, esta habilidade pode não ser uma vantagem para a adesão específica na mucosa do rúmen (SANDHU et al., 1996).

A adesão dos isolados de STEC de origem bovina às células eucarióticas analisadas representou uma propriedade de virulência marcante, uma vez que mais de 95% dos isolados aderiram a pelo menos uma linhagem celular, sendo esta adesão mais acentuada em relação às células HEp-2 (90,5%) que em HeLa (66,7%). Estes dados corroboram com os achados do estudo de Rocha et al. (2011), que constataram uma elevada frequência (87,5%) de isolados bovinos aderentes às células humanas. Por outro lado, alguns autores têm

demonstrado uma diminuição desta frequência, como Wieler et al. (1998) que observaram um índice de apenas 67% de adesão dos isolados de STEC às células humanas. Esses dados, bem como os do presente estudo demonstram uma heterogeneidade na distribuição geográfica de STEC, interferindo na capacidade de adesão e, consequentemente, no seu potencial de infecção às células humanas.

O primeiro passo na contaminação de superfícies de contato de alimentos é a adesão das células bacterianas ao substrato, um processo que pode ser influenciado por um grande número de propriedades, tais como: a expressão de fímbrias, hidrofobicidade da superfície celular e formação de biofilme (BOYER et al., 2007).

No presente estudo, verificou-se que 76,2% das amostras tinham capacidade de produzir biofilme. Biscola et al. (2011) analisaram 33 amostras STEC não-O157, 16 delas (48%) formaram biofilme em microplacas de poliestireno com 96 poços, em 48 horas, a 37°C. Já para 18 isolados STEC O157, oito (44%) produziram biofilme nas condições acima relatadas.

Biofilmes são estruturas altamente complexas, contendo microcolônias separadas por microcanais de água e podem tornar antibióticos e biocidas ineficazes. As células derivadas de biofilme são, geralmente, mais resistentes às condições ambientais adversas do que em sua forma planctônica. A formação do biofilme é um processo dinâmico de várias fases. Inicialmente, a superfície afetada é coberta com um filme de moléculas orgânicas. A adesão reversível da bactéria pode ser seguida por adesão irreversível, com o crescimento e produção de um polímero extracelular (COSTERTON et al., 1999).

Outro fator que está intimamente ligado à produção de biofilme é a expressão de fímbrias curli. Dentre os 21 isolados estudados, apenas sete (33,3%) expressaram curli a 28°C, após 48 horas. Proporção esta parecida com o trabalho de Biscola et al. (2011) que observaram que, dentre 33 amostras de STEC não- O157, 14 (42%) expressaram curli em ágar vermelho-congo, após 48 horas, a 28°C. Entretanto, utilizando-se 18 amostras de STEC O157, apenas 5 amostras (28%), expressaram curli nas condições acima citadas. No entanto, Cookson et al. (2002), verificaram que a expressão de curli em 26 amostras de STEC, positivas para o gene *csgA* se deu em somente 5 isolados (19,2%), evidenciando que a presença do gene, não implica, obrigatoriamente, a expressão do fenótipo.

É possível que a produção de curli melhore a autoagregação bacteriana, aumentando, por consequência, a habilidade de se ligar/unir em superfícies (DEL RE et al., 2000). Amostras produtoras de fímbria curli são mais hidrofóbicas que amostras não-produtoras de curli (BOYER et al., 2007).

A prevalência da adesina EhaA nas amostras do presente estudo assemelham- se ao trabalho de Biscola et al. (2011) que, dentre 33 isolados de STEC não-O157, 24 (73%) foram considerados positivos para o gene *ehaA^a* e 27 (82%) foram positivos para o gene *ehaA^b*. Já para 18 amostras de STEC O157, 17 (94%) confirmaram-se como positivas para o gene *ehaA^a* e todas as 18 amostras foram positivas para o gene *ehaA^b* (BISCOLA et al.,

2011).

A adesina designada como “*EHEC autotransporter*” (Eha) foi identificada em inúmeras amostras de STEC de diferentes origens, algumas delas (EhaA, EhaB e EhaJ) foram implicadas na ligação com superfícies bióticas e abióticas (WELLS et al., 2009) (POLIFRONI et al., 2012). A EhaA promove a adesão às células epiteliais primárias da porção terminal do reto em bovinos (WELLS et al., 2009).

Em outro estudo, o gene *ehaA* foi muito prevalente em amostras de STEC, independentemente do sorotipo, origem e presença da região LEE, com distribuição de 98% e 95% em humanos e bovinos, respectivamente WU et al., 2010).

A prevalência da adesina *LpfAO113* nos isolados estudados (61,9%) se mostrou diferente de outros trabalhos. Tatarczak et al. (2005) observaram que, dentre 74 amostras de STEC provenientes de diferentes fontes, 25 (33,8%) foram positivas para o gene *LpfAO₁₁₃*. Esses 25 isolados pertenciam tanto a sorogrupos de STEC O157, quanto não-O157.

O segundo gene em prevalência detectado foi o gene *LpfA_{O113}*. Segundo Osek et al. (2003) esse gene estava presente apenas nas amostras de STEC LEE- negativas, no entanto, outros estudos têm demonstrado a presença deste gene em amostras LEE- positivas (TOMA et al., 2004; CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; WU et al., 2010).

Em relação à adesina *Iha*, sua frequência tem variado em alguns estudos de 60 a 94% em isolados de fezes bovinas (TATARCZAK et al., 2005; WU et al., 2010), contrastando com a frequência de 23,8% observada nos isolados deste estudo.

Nesta pesquisa não foi identificada a presença do gene da adesina *Efa1* em nenhum isolado. Diferentemente de Tatarczak et al. (2005) que constataram em 42 de 74 isolados de STEC de várias fontes (56,7%) foram positivos para a pesquisa de genes *efa1*. Porém, Wu et al. (2010), dentre 171 amostras de STEC isoladas de bovinos saudáveis, observaram a presença dos genes *efa1* e *eaeA* em somente duas amostras (1,2%) cada.

Ainda nesta pesquisa, o gene da adesina *Saa* foi evidenciado em 7 isolados (33,3%), mostrando ligação com a presença conjunta da citotoxina *SubA*. Esta associação foi observada também por Orden et al. (2011), onde sete de nove amostras STEC *subAB*- positivas isoladas de gado saudável, foram também positivas para *stx2* e *saa*. Outros estudos mostraram associação entre os genes *subAB* e *saa* isolados de gados (CERGOLE-NOVELLA et al., 2007; KARAMA et al., 2008) . A adesina *Saa* foi identificada em maior proporção entre isolados provenientes de gado saudável (90%) que em relação a amostras isoladas de pacientes diarreicos (3,3%) (WU et al., 2010).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permite concluir que:

- Dos genes das três toxinas pesquisadas, o da citotoxina Stx2, seguido pelo gene da SubA, são os mais prevalentes nas amostras de STEC isoladas de fezes bovinas analisadas.
- As amostras de STEC analisadas possuem uma elevada capacidade de infetar células humanas *“in vitro”*, principalmente células HEp-2.
- Todas as quatro propriedades de adesão analisadas (formação de biofilme, hemaglutinação, expressão de curli e hidrofobicidade) influenciaram no processo de adesão das STEC em células HEp-2.
- A distribuição dos genes das adesinas nos isolados pesquisados ocorreu de forma heterogênea, podendo-se afirmar que existe uma ampla variabilidade genética entre as amostras, sendo que o gene da adesina EhaA foi o mais prevalente dentre as amostras pesquisadas, seguido pelo gene da adesina LpfAO113.
- Os genes das adesinas LpfAO113 e EhaA foram os únicos que influenciaram no processo de adesão às células HEp-2, assim como interferiram positivamente na expressão da maioria das propriedades de adesão. Por outro lado, os outros quatro genes pesquisados parecem não desempenhar um papel relevante para a interação nas bactérias analisadas.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLI, S. P., TRACHTMAN, H., ACHESON, D. W., SIEGLER, R. L., OGRIG, T. G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v.17, n. 4, p. 293-298, 2002.
- BEN NASR, A., OLSÉN, A., SJÖBRING, U., ESTERL, W.M., BJÖRCK, L. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli- expressing *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 927-935, 1996.
- BERKELMAN, R.L. Introduction-demographic and social changes have contributed to the emergence of infectious diseases. **ASM Press**, p. 1-19, 1997.
- BETTELHEIM, K. A. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: a red herring? **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 201-202, 2001.
- BEUTIN, L., ALEKSIC, S., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology Immunity**, v. 34, p. 13-21, 1994.
- BEUTIN, L., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. Human infections with Shiga toxinproducing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emergent Infectious Disease**, v. 4, n.4, p. 635-639, 1998.
- BISCOLA, F.T., GUTH, B.E.C., ABE, C.M. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2201-2208, 2011.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A., DAHBI, G., ALONSO, M. P., GONZÁLEZ, E. A., BERNÁRDEZ, M. I., BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types Shiga-toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain: Identification of a new intimin variant gene (eae-e). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 645-651, 2004.
- BOERLIN, P., McEWEN, S.A., BOERLIN-PETZOLD, F., WILSON, J.B., JOHNSON, R.P., GYLES, C.L. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.3, p. 497-503, 1999.
- BOYER, R.R., SUMNER, S.S., WILLIAMS, R.C. Influence of curli expression by *Escherichia coli* O157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. **Journal of Food Protection**, v.70, p. 1339-1345, 2007.
- BRYCE, J. et al. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v.365, n.9465, p.1147-1152, 2005.
- BYRNE, L., JENKINS, C., LAUNDERS, N., ELSON, R., ADAK, K. The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in England, 2009 – 2012. **Epidemiology Infection**, p. 1-13, 2015.
- CANPOLAT, N. *Hemolytic uremic syndrome*. **Turkish Archives of Pediatrics**, n. 50, p. 73-82, 2015.

CERGOLE-NOVELLA, M.C., NISHIMURA, L.S. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 329- 334, 2007.

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

CORNICK, N. A., BOOHER, S. L., MOON, H. W. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2704-2707, 2002.

COOKSON, A.L., COOLEY, W.A., WOODWARD, M.J. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Medicine Microbiology**, v. 292, p. 195-205, 2002.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

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

DA RE, S., GHIGO, J. M. A. CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.8, p. 3073- 87, 2006.

DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., MOON, H. W., O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4560-4563, 1998.

DEL RE, B., SGORBATI, B., MIGLIOLI, M. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 438-442, 2000.

DIEZ-GONZALEZ, F., CALLAWAY, T.R., KIZOOLIS, M.G., RUSSEL, J.B. Grain feeding and the dissemination of acid-resistance *Escherichia coli* from cattle. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1666-1668, 1998.

DYER, J.G., SRIRANGANATHAN, N., NICKERSON, S.C. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.1, p.193-201, 2007.

DONNENBERG, M. S., TZIPORI, S., MCKEE, M. L., O'BRIEN, D. O., ALROY, J., KAPER, J. B. The role of *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. **Journal of Clinical Investigation**, v 92, n. 3, p. 1418-1424, 1993.

DUFFY, G., GARVEY, P., McDOWELL, D. A. Nomenclature of verocytotoxin in Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Trumbull, Ct: **Food and Nutrition Press, Inc.**, p. 447-452. 2001.

EVANS, D.J., EVANS, D.G., HÖHNE, C., NOBLE, M.A. Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13 no. 1, p. 171-178, 1981.

FARFAN, M.J., TORRES, A.G. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 80, p. 903-913, 2012.

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

FENG, P. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.1, n. 2, p. 47-52, 1995.

FRANKEL, G., CHEN, H.D. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 83-98, 2005.

FREEMAN, D. J., FALKINER F. R., KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42; p. 872-874, 1989.

FRIEDRICH, A.W., BIELASZEWSKA, M. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants frequency and association with clinical symptoms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 74-84, 2002.

GARCÍA-ALJARO, C., MUNIESA, M., JOFRE, J. Newly identified bacteriophages carrying the *stx2g* shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, p. 127-135, 2006.

GIOFFRE, L.M., MEICHTRI, L., MILIWEBSKY, E., BASCHKIER, A. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina: Evaluation of two procedures. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 301-313, 2002.

GIRARD, F., BATISSON, I., FRANKEL, G. M., HAREL, J., FAIRBROTHER, J. M. Interaction of enteropathogenic and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and tir in adherence. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 6005-6016, 2005.

GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Reviews**, v.13, p.60-98, 1991.

GYLES, C.L. *Escherichia coli. Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2 ed. Iowa State: Ames University Press, p. 133-153, 1993.

TORRES, A.G. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. **Bentham Science Publishers Ltd.** United States, p. 65-83, 2010.

HABIB, N.F., JACKSON, M.P. Roles of a ribosomebinding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga-toxin genes. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 3, p. 597-603, 1993.

HAMMAR, M., ARNQVIST, A., BIAN, Z., OLSEN, A., NORMARK, S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, p. 661-670, 1995.

HANCOCK, D.D., BESSER, T.E., RICE, D.H. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. **ASM Press**, p. 85-91, 1998

HAYASHI, T., MAKINO, K., OHNISHI, M., KUROKAWA, K., ISHII, K., YOKOYAMA, K., HAN, C., OHTSUBO, E., NAKAYAMA, K., MURATA, T., TANAKA, M., TOBE, T., IIDA, T., TAKAMI, H., HONDA, T., SASAKAWA, C., OGASAWARA, N., YASUNAGA, T., KUHARA, S., SHIBA, T., HATTORI, M., SHINAGAWA, H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Research**, v. 8, n. 1, p. 11-22, 2001.

HEAD, S.C., KARMALI, M., LINGWOOD, C.A. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 6, p. 3617-3621, 1991.

HEUVELINK, A.E., VAN HEERWAARDEN, C. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. **Epidemiology Infectious Diseases Journal**, v. 129, n. 2, p. 295-302, 2002.

HORNITZKY, M. A., VANSELOW, B. A., WALKER, K., BETTELHEIM, K. A., CORNEY, B., GILL, P., BAYLEY, G., DJODJEVIC, P. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. **Applied Environmental Microbiology** v. 68, 6439-6445, 2002.

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

JACKSON, M.P., NEILL, R.J., O'BRIEN, A.D., HOLMES, R.K., NEWLAND, J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 109-114, 1987.

JENKINS, C., NEIL, T., PERRY, N.P., CHEASTY, T., SHAW, J.D.J., FRANKEL, G., DOUGAN, G., GUNN, G.J., SMITH, H.R., PATON, A.W., PATON, J.C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1775-1778, 2003.

JOHNSON, W.M., LIOR, H.; BEZANSON, G.S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **Lancet**, v.1, p. 76-80, 1983.

KARAMA, M., JOHNSON, R.P., HOLTSLANDER, R. Prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in cattle from an Ontario abattoir. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 297-302, 2008.

KARMALI, M.A., PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P.C., ARBUS, G.S., LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Disease**, v. 151, p. 775- 782, 1985.

KOCH, C., HERTWIG, S., LURZ, R., APPEL, B., BEUTIN, L. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx1OX3* gene, which is closely associated with Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains from sheeps and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 3992-3998, 2001.

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

KREPSKY, N., FERREIRA, R.B.R., NUNES, A.P.F., LINS, U.G.C. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **Current Microbiology**, v. 46, p. 280-286, 2003.

LOZER, D.M., SOUZA, T.B., MONFARDINI, M.V., VICENTINI, F., KITAGAWA, S.S., SCALETSKY, I.C.A., SPANO, L.C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**, n. 13, p.1-6, 2013.

LUIS, P., ISABEL, C., MALINA, M., ELIZABETH, M., GLADYS, G., CONSTANZA, M., CAROLINA, C., MARIANO, N., EUGENIA, Z., MARTA, R. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 304, p. 499-504, 2014.

MAINIL, J. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Veterinary Research**, v. 30, p. 235-257, 1999.

MAKINO, S., KOBURI, H., ASAOKA, H. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. v. 125, p. 55-61, 2000.

MELTON-CELSEA, A.R., O'BRIEN, A.D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga-toxin producing E. coli strains*. Washington, DC: **ASM Press**, p. 121-128, 1998.

McKEE, M.L., MELTON-CELSA, A.R., MOXLEY, R.A., FRANCIS, D.H., O'BRIEN, A.D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3739-3744, 1995.

MIKO, A., RIVAS, M., BENTANCOR, A., DELANNOY, S., FACH, P., BEUTIN, L. Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 in cattle, deer and humans from Argentina and Germany. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 1-14, 2014.

MOBLEY, H.L.T., KAPER, J.B., NATARO, J.P. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

MORA, A., BLANCO, J.E., BLANCO, M., ALONSO, M.P. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 793-806, 2005.

MORINAGA, N., YAHIRO, K., MATSUURA, G. Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.75, p.488-496, 2007.

NAKAJIMA, H., KIYOKAWA, N., KATAGIRI, Y.U., TAGUCHI, T., SUZUKI, T., SEKINO, T., MIMORI, K., EBATA, T., SAITO, M., NAKAO, H., TAKEDA, T., FUJIMOTO, J. Kinetic Analysis of Binding between Shiga Toxin and Receptor Glycolipid Gb3Cer by Surface Plasmon Resonance. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 46, p. 42915-42922, 2001.

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

NEWTON, H.J., SLOAN, J., BULACH, D.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for Locus of Enterocyte Effacement. **Emerging Infection Diseases Journal**, v. 15, p. 372-380, 2009.

NICHOLLS, L., GRANT, T.H., ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 275-288, 2000.

NIELSEN, E.M., SKOV, M.N., MADSEN, J.J. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild and rodents in close proximity to farms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6944-6947, 2004.

O'BRIEN, A.D., HOLMES, R.K. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: NEIDHARDT, F.C., CURTISS III, R., INGRAHAM, J.L., LIN, E.C.C., LOW, K.B., MAGASANIK, B., REZNIKOFF, B.S., RILEY, M., SCHAECHTER, M., UMBARGER, H. E. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington, DC: **ASM Press**, p. 2788-2802, 1987.

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

OLSEN, A., ARNQVIST, A., HAMMAR, M. The RpoS sigma factor relieves H-NS- mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 7, p. 523-536, 1993.

OLSEN, A., HERWALD, H., WIKSTRÖM, M., PERSSON, K. Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34568- 34572, 2002.

ORDEN, J.A., HORCAJO, P., DE LA FUENTE, R. Subtilase cytotoxin-coding genes in Verotoxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and goats differ from those from cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8259- 8264, 2011.

OSEK J., WEINER, M., HARTLAND, E.L. Prevalence of the *lpfO113* gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 259-266, 2003.

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

PATON, A.W., RATCLIFF, R.M., DOYLE, R.M., SEYMOUR-MURRAY, J., DAVOS, D., LANSER, J.A., PATON, J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1622-1627, 1996.

PATON, A.W., PATON, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.598-602. 1998a.

PATON, J.C., PATON, A.W. Patogenesis and diagnosis of Siga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998b.

PATON, A.W., SRIMANOTE, P., WOODROW, M.C., PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999-7009, 2001.

PATON, A.W., SRIMANOTE, P., TALBOT, U.M. A new family of potent AB₅ cytotoxins produced by Shiga toxicigenic *Escherichia coli*. **Journal of Experimental Medicine**, v.200, p. 35-46, 2004.

PATON, A.W., PATON, J.C. Multiplex PCR for direction, of shiga toxicigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. **Journal of Clinical Microbiology**, 43: 2944-2947, 2005.

PATON, A.W., BEDDOE, T., THORPE, C.M., WHISSTOCK, J.C. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. **Nature**, v.443, p.548- 552, 2006.

PATON, A.W., PATON, J.C. *Escherichia coli* subtilase cytotoxin. **Toxins**, v.2, p.215- 228, 2010.

PERNA, N.T., PLUNKETT, G., BURLAND, V., MAU, B., GLASNER, J.D., ROSE, D. J., MAYHEW, G.F., EVANS, P.S.; GREGOR, J., KIRKPATRICK, H.A., PÓSFAI, G., HACKETT, J., KLINK, S., BOUTIN, A., SHAO, Y., MILLER, L., GROTBEC, E.J., DAVIS, W., LIMK, A., DIMALANTAK, E.T., POTAMOUSIS, K.D., APODACA, J., ANANTHARAMAN, T.S., LIN, J., YEN, G., SCHWARTZ, D.C., WELCHI, R.A., BLATTNER, F.R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

PIGATTO, C P. *Isolamento e freqüência de Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no Estado do Paraná*. Curitiba, 2003. 85f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Área de concentração Patologia, Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

POLIFRONI, R., ETCHEVERRÍA, A., SANZ, M.E., CEPEDA, R.E. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the environment of a dairy farm. **Current Microbiology**, v. 65, p. 337-343, 2012.

PRUIMBOOM-BREES, I.M., MORGAN, T.W., ACKERMANN, M.R., SAMUEL, J.E., CORNICK, N.A., MOON, H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **PNAS**. v. 97, p. 10325-10329, 2000.

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

ROBINS-BROWNE, R.M., ELLIOT, E., DESMARCHELIER, P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia. **ASM Press**, p. 66-72, 1998.

ROCHA, S.P.D., ABE, C.M., SPERANDIO, V. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional Locus of Enterocyte Effacement genes can be attaching- and-effacing negative in cultured epithelial cells. **Infection and Immunity**. v. 79, n. 5, p. 1833-1841, 2011.

SALES, S.S., COSTA, F.N., ALVES, L.M.C., BARROZO, L.M., NETO, V.M. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxinas "Shiga" (STEC) na microbiota intestinal de bovinos destinados ao abate no município de São Luís - MA / Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 245-251, 2006.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis, a molecular approach**. United States: ASM Press, v. 16, p. 190-204, 1994.

SANDHU, K.S., CLARKE, R.C., McFADDEN, K. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. **Epidemiology Infection**, v. 116, p. 1-7, 1996.

SCALETSKY, M. L. M. S., TRABULSI, L. R. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

SCHIMIDT, H., BEUTIN, L., KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H., KARCH, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2364- 2367, 1996.

SCHMIDT, H., SCHLÖRICKE, E., FISLAGE, R., SCHULZE, H.A., GUTHOFF, R. Effect of surface modifications of intraocular lenses on the adherence of *Staphylococcus epidermidis*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 287, p. 135-145, 1998.

SHERLOCK, O., VEJBORG, R.M., KLEMM P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 73.4, 1954-1963, 2005.

SPIKA, J.S., KHAKHRIA, R., MICHEL, P., MILLEY, D., WILSON, J., WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canada. **ASM Press**, p. 23-29, 1998.

SPINA, N., ZANSKY, S., DUMAS, N., KONDRAKI, S. Four laboratory-associated cases of infection with *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2938-2939, 2005.

STEPANOVIC', S., CIRKOVIC, L., SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STEVENS, M.P., VAN DIEMEN, P.M., FRANKEL, G., PHILLIPS, A.D., WALLIS, T.S. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxinproducing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, 5158-5166, 2002.

SZALO, I. M., GOFFAUX, F., PIRSON, V., PIÈRARD, D., BALL, H., MAINIL, J. Presence of bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 653-658, 2002.

TARR, P.I., BILGE, S.S., VARY, J.R., JELACIC, S., HABEEB, R.L., WARD, T.R.,

BAYLOR, M.R., BESSER, T.E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1400-1407, 2000.

TATARCZAK, M., WIECZOREK, K., POSSE, B., OSEK, J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 77-85, 2005.

TOMA, C., ESPINOSA, E.M., SONG, T. Distribution of putative adhesions in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4937-4946, 2004.

TORRES, A.G., GIRON, J.A., PERNA, N.T., BURLAND, V., BLATTNER, F.R., AVELINO-FLORES, F., KAPER, J.B. Identification and Characterization of *lpfABCC'DE*, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 70, n.10, p. 5416-5427, 2002.

TORRES, A.G., KAPER, J.B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa Cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4985-4995, 2003.

TOZZOLI, R., CAPRIOLI, A., CAPPANELLA, S. Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p.178-183, 2010.

THORPE, C.M., RITCHIE, J.M., ACHESON, D.W.K. Enterohemorrhagic and other Shiga toxin producing *Escherichia coli*. In: DONNENBERG, M. S. (Ed.). *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. San Diego, CA: Academic Press, p. 119-154, 2002.

TSCHAPE, H., FRUTH, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: MÜLDORFER, I., SCHÄFER, K.P. Emerging bacterial pathogens. v. 8. In: SCHMIDT, A. (Ed.) **Contributions to Microbiology**. Basel: Karger, p. 1-11, 2001.

UHLICH, G.A., COOKE, P.H., SOLOMON, E.B. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p.2564-72. 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. CDC National health report: Leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors – United States, 2005 – 2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 63, n.4, p.1-27, 2014.

VAN DIEMEN, P. M., DZIVA, F., STEVENS, M. P., WALLIS, T. S. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1735-1743, 2005.

VAZ, T.M.I., IRINO, K., KATO, M.A.M.F., DIAS, A.M.G., GOMES, T.A.T., MEDEIROS, M.I.C., ROCHA, M.M.M., GUTH, B.E.C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 903-905, 2004.

VELANDIA, C.V.G., MARIEL SANSO, A., KRÜGER, A. Occurrence of subtilase cytotoxin and relation with other virulence factors in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food and cattle in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 711-715, 2011.

WATAHIKI, M., ISOBE, J., KIMATA, K., SHIMA, T., KANATANI, J., SHIMIZU, M., NAGATA, A. et al. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p.2757-2763, 2014.

WELLS, T.J., McNEILLY, T.N., TOTSIKA, M. The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 1803-1814, 2009.

WHIPP, S.C., RASMUSSEN, M.A., CRAY Jr, W.C. Animals as a source as *Escherichia coli* pathogenic for human beings. **JAMA**, v.204, p.1168-1175, 1994.

WIELER, L.H., SCHWANITZ, A., VIELER, E., BUSSE, B. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.6, p. 1604-1607, 1998.

WU, Y., HINENOYA, A., TAGUCHI, T., NAGITA, A. Distribution of Virulence Genes Related to Adhesins and Toxins in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Cattle and Diarrheal Patients in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, p. 589-597, 2010.

ZHANG, W., BIELASZEWSKA, M., KUCZIUS, P., KARCH, H. Identification, characterization and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1441-1446, 2002.

THIAGO DE BRITO PINHEIRO - Graduado em Enfermagem pela Universidade Estadual do Piauí (UESPI) em 2005. Realizou Especialização Lato Sensu em Saúde Pública pelo Instituto Superior de Ensino Carlos Ulisses Boyd (ISECUB) em 2005, Saúde da Família pela Universidade Federal do Piauí (UFPI) em 2008, Terapia Intensiva pela Universidade Estadual do Piauí (UESPI) em 2008 e Saúde Materno-Infantil pela Universidade Federal do Maranhão (UFMA) em 2012. Concluiu o Mestrado Acadêmico em Biologia Parasitária pela Universidade CEUMA em 2015. Possui formação acadêmica em Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa (MTC). É Enfermeiro da Estratégia Saúde da Família (ESF) no município de São Luís- MA e atua na Unidade do Sistema Neuromuscular no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). Possui experiência na área de docência superior na área de enfermagem, tendo atuado nas seguintes faculdades: Faculdade Santa Terezinha (CEST), Faculdade Atenas Maranhense (FAMA) e Faculdade Pitágoras.

VALÉRIO MONTEIRO NETO - Possui Graduação em Farmácia-Bioquímica (Universidade Federal do Maranhão, 1988), Doutorado em Ciências (área de concentração em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Universidade de São Paulo, 2000) e realizou pós-doutorado no Departamento de Microbiologia da Universidade do Arizona (2005-2006, EUA). Atualmente é Professor Associado na Universidade Federal do Maranhão. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Médica, atuando principalmente nos seguintes temas: patogenicidade bacteriana, bioprospecção de produtos com atividade antimicrobiana e microbiologia oral.



PROPRIEDADES DE ADESÃO E CITOTOXICIDADE DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PRODUTORA DA TOXINA DE SHIGA (STEC) DE ORIGEM BOVINA

- 🌐 www.atenaeditora.com.br
- ✉ contato@atenaeditora.com.br
- 👤 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
- 👤 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

PROPRIEDADES DE ADESÃO E CITOTOXICIDADE DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PRODUTORA DA TOXINA DE SHIGA (STEC) DE ORIGEM BOVINA

- 🌐 www.atenaeditora.com.br
- ✉ contato@atenaeditora.com.br
- 👤 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
- 👤 www.facebook.com/atenaeditora.com.br