

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Cláudia de Moura

“CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE
BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA: PESQUISA DE FATORES DE
COLONIZAÇÃO E TOXINAS”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
CLÁUDIA DE MOURA
D
e aprovada pela Comissão Julgadora.
DSL

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

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Campinas
2005

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

| | |
|--------------|--|
| M865c | <p>Moura, Cláudia de Caracterização de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com e sem diarreia: pesquisa de fatores de colonização e toxinas / Cláudia de Moura.— Campinas, SP: [s.n.], 2005.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Domingos da Silva Leite. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p style="text-align: center;">1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Diarreia. 3. Bovino. 4. Reação de cadeia da polimerase. 5. Virulência (Microbiologia). I. Domingos da Silva Leite. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> |
|--------------|--|

Título em inglês: Characterization of *Escherichia coli* strains isolated of diarrheic and healthy calves: a colonization factors and toxins study.

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Escherichia coli*, diarrhea, calves, PCR, virulence factors.

Área de Concentração: Microbiologia.

Banca Examinadora: Domingos da Silva Leite, Tomomasa Yano, Sérgio Mendonça.

Data da defesa: 11/04/2005.

Campinas, 11 de abril de 2005.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite (Orientador)



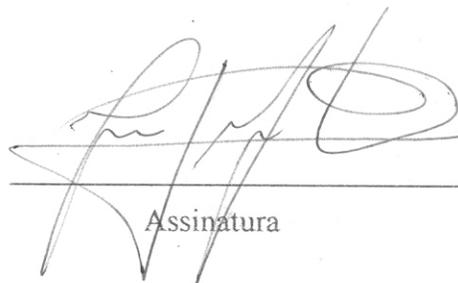
Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Mendonça



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

"Nunca se vence uma guerra lutando sozinho...".
(Raul Seixas)

Dedico este trabalho a meu
pai Mario Roberto Camargo
de Moura, em homenagem
póstuma, pois a sua garra
ainda reina em mim.

Reconhecimento

À minha mãe, **Dusolina Romancini de Moura** por tudo que fez por mim, pela paciência, tolerância e apoio incondicional, mesmo quando eu “chutava o balde” (com certeza você terá um lugarzinho reservado no céu, ao lado de todos os anjos bondosos...);

Ao **Henrique R. de Oliveira**, meu candeeiro, por dizer que me ama todos os dias;

Agradecimentos

Agradeço:

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela orientação, preocupação, paciência, consideração e acima de tudo por acreditar na minha capacidade. A ele, toda minha admiração;

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, chefe do Depto. Microbiologia e Imunologia, pela grande ajuda em pré-banca e banca examinadora;

A Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, não apenas como exemplo de profissional que é, mas por tudo que me ensinou, em todos os sentidos, pela orientação nos momentos de necessidade (e que não foram poucos...), incentivo no PED, pela grande ajuda em pré-banca e por me dar o prazer de desfrutar de sua amizade;

Ao Prof. Dr. Sérgio Mendonça, pelo aceite de convite de banca examinadora;

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela orientação em pré-banca;

Aos funcionários Erivaldo Silva, Ana Lucia Soledade, Sandra Martins, Mirtis Ferraz e Evandro, pelos ensinamentos, pois sem eles eu não conseguiria seguir meu caminho, e pela grande amizade que construímos;

Aos colegas de Departamento: Cris, Monique, Patrícia, Jaqueline, Mario Paulo, pela amizade e por todas as horas agradáveis que passamos juntos;

Ao amigo Geórgio F. Valadares, pela ajuda e principalmente pela nossa amizade, que espero durar para sempre;

A minha amiga Daniela Ceratti pelo apoio moral e sempre me incentivando quando achei que nada iria dar certo;

Aos meus familiares, por se orgulharem de mim;

Aos meus amigos, Cristina, Claudemir, Éder, Erick e todos da turma da Ponte São João, pois tudo seria mais difícil sem grandes pessoas a minha volta;

As amigas Edilaine e Andréia, pelas longas conversas e pela força que me deram sempre, foi como uma luz no fim do túnel;

A Universidade Estadual de Campinas, por promover o crescimento, a maturidade e o conhecimento a todos os alunos;

A Pontifícia Universidade Católica de Campinas, por me apresentar ao fascinante mundo da Biologia;

A Profa. Dra. Rosemary, por me incentivar ao estudo em Microbiologia;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice Geral

| | |
|---|----|
| Índice de Quadros e tabelas..... | 11 |
| Lista de Abreviaturas..... | 12 |
| Resumo..... | 13 |
| Abstract..... | 14 |
| | |
| 1. Introdução..... | 15 |
| 1.1. Diarréia e Disenteria em bezerros..... | 15 |
| 1.2. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)..... | 17 |
| 1.3. <i>Escherichia coli</i> produtoras de lesão “attaching and effacing” (AEEC)..... | 21 |
| 1.4. <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxinas..... | 25 |
| 1.4.1. <i>Escherichia coli</i> produtoras de verotoxigênica (VTEC e EHEC)..... | 25 |
| 1.4.2. <i>Escherichia coli</i> produtoras de Fator Necrosante Citológico (NTEC)..... | 27 |
| 1.5. <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativas (EAEC)..... | 32 |
| | |
| 2. Objetivos..... | 35 |
| | |
| 3. Material e Métodos..... | 36 |
| 3.1. Amostras de Campo..... | 36 |
| 3.2. Amostras Padrão..... | 36 |
| 3.3. Obtenção do DNA bacteriano..... | 37 |
| 3.4. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.5. Ensaio para a detecção de Hemolisina e Enterohemolisina em amostras de <i>E. coli</i> | 40 |
| 3.6. Detecção da atividade da Verotoxina em ensaios de citotoxicidade celular..... | 40 |
| 3.6.1. Preparo das amostras..... | 40 |
| 3.6.2. Preparo da linhagem celular..... | 40 |
| 3.7. Determinação dos Sorogrupos..... | 41 |
| 3.8. Análise Estatística..... | 42 |
| | |
| 4. Resultados..... | 43 |
| 4.1. Detecção de Fatores de Colonização (FC)..... | 43 |
| 4.2. Detecção de Toxinas..... | 44 |
| 4.3. Determinação dos Sorogrupos..... | 44 |
| 4.4. Associação de Fatores de Virulência e Sorogrupos..... | 45 |
| | |
| 5. Discussão..... | 54 |
| | |
| 6. Conclusões..... | 65 |
| | |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 67 |

Índice de Quadros e Tabelas

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Seqüências de oligonucleotídeos utilizadas por iniciadores para ensaios de PCR e tamanho (pb) expressados por amplificadas..... | 38 |
| Quadro 2. Temperaturas de anelamento para iniciadores dos fatores de virulência pesquisados por PCR..... | 39 |
| Tabela 1. Número de amostras totais e fatores de colonização em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com e sem diarréia..... | 47 |
| Tabela 2. Toxinas em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com e sem diarréia..... | 48 |
| Tabela 3. Sorogrupos de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com e sem diarréia..... | 49 |
| Tabela 4. Distribuição de sorogrupos em amostras de <i>Escherichia coli</i> com e sem diarréia..... | 49 |
| Tabela 5. Associação de fatores de colonização e toxinas em amostras de <i>Escherichia coli eae+</i> isoladas de bezerros com e sem diarréia..... | 50 |
| Tabela 6. Associação dos fatores de colonização e toxinas em amostras de <i>Escherichia coli eae-</i> isoladas de bezerros com e sem diarréia..... | 51 |
| Tabela 7. Associação de sorogrupos com fatores de virulência em amostras de <i>Escherichia coli eae+</i> isoladas de bezerros com e sem diarréia..... | 52 |
| Tabela 8. Amostras de <i>Escherichia coli eae-</i> : Associação de sorogrupos com fatores de virulência | 53 |

Lista de Abreviaturas

- AAF: Fímbria de aderência agregativa
- AEEC: *E. coli* causadora de lesão Attaching and Effacing
- BFP: Bundle-forming pillus
- CDT: Toxina Citoletal Distensora
- CNF: Fator Necrosante Citotóxico
- EAEC: *E. coli* Enteroagregativa
- EAF: *E. coli* Aderence Factor
- EAST1: Toxina Termo-estável de *E. coli* Enteroagregativa
- EHEC: *E. coli* Enterohemorrágica
- EPEC: *E. coli* Enteropatogênica
- ETEC: *E. coli* Enterotoxigênica
- Ehly: Enterohemolisina
- FC: Fator de Colonização
- FV: Fator de Virulência
- GC-C: Guanilato ciclase C
- HC: Colite Hemorrágica
- Hly: Hemolisina
- HUS: Síndrome Urêmica Hemolítica
- LEE: Locus of Enterocyte Effacement
- LT: Toxina Termo-lábil
- Lesão A/E: Lesão Attaching and Effacing
- NTEC: *E. coli* produtora de Fator Necrosante Citotóxico
- STa: Toxina Termo-estável tipo a
- STb: Toxina Termo-estável tipo b
- VT: Verotoxina
- VTEC: *E. coli* produtora de Verotoxina

Resumo

Infecções por *Escherichia coli* são uma das maiores causas de diarreia em animais, entre eles os bezerros, sendo assim responsáveis por importantes danos econômicos na pecuária. Em nosso trabalho 58 *E. coli* originárias de bezerros com diarreia e 43 *E. coli* isoladas de bezerros sem diarreia, foram analisadas por ensaios de PCR (reação da polimerase em cadeia) quanto à presença dos genes para fatores de virulência *eae*, EAF, K99, F41, CS31A, F17, STa, LT-II, VT1, VT2, Hly, Ehly, CDT, CNF1, CNF2 e EAST1. Foram também realizados ensaios de citotoxicidade em células Vero para a expressão da Verotoxina (VT) e testes sorológicos para determinação dos sorogrupos. Os fatores de colonização (FC) foram detectados em 31 amostras, sendo 28 originárias de bezerros com diarreia e três amostras de bezerros saudáveis, onde 26 foram CS31A e onze F17, com seis delas apresentando CS31A/F17 associados. O gene *eae* esteve presente em 43 *E. coli*, sendo 35 isolados de animais com diarreia. Os FC K99, F41 e EAF não foram detectados. Quanto às toxinas pesquisadas, a mais freqüente foi a toxina VT1 presente em 43 *E. coli*, sendo 24 de origem de animais diarreico e 19 de bezerros saudáveis. Quarenta amostras foram EAST1, com 17 amostras foram isoladas de bezerros com diarreia, dez amostras foram VT2+ com seis delas isoladas de bezerros saudáveis. Oito amostras foram Ehly, seis CDT, quatro CNF2 e apenas duas LT-II. Nenhuma amostra foi positiva para Hly, STa e CNF1. A expressão fenotípica de VT e Ehly foram confirmadas em ensaios *in vitro*. Onze amostras foram negativas para todos os fatores de virulência pesquisados. Vinte amostras mostraram associação *eae*/VT1 e 13 foram CS31A/VT1. Foram detectados 35 sorogrupos entre as *E. coli* estudadas. A associação entre CS31A e VT1 não tinha sido descrita na literatura até o presente momento e a grande associação entre o gene *eae* e a toxina VT1 mostram que bezerros podem ser considerados como reservatórios de VTEC.

Abstract

Infections caused by *Escherichia coli* are the most cause of diarrhea in animals, bovines and cattle, being thus responsible for important economic losses in farms. In this work, 58 strains isolated from calves with diarrhea and 43 strains isolated from healthy calves were studied for PCR analysis about the virulence factors *eae*, EAF, K99, F41, CS31A, F17, STa, LT-II, VT1, VT2, Hly, Ehly, CDT, CNF1, CNF2 and EAST1. We utilized techniques *in vitro* for the VT and Ehly production and serological assays for detecting serogroups. Of the studied strains, 31 of them were positive for colonization factors, being 28 isolated from diarrheic calves and five isolated from healthy calves, where 26 were CS31A+, eleven F17 and an association between CS31A/F17 was found in six strains from diarrheic calves. The *eae* gene was present in 43 strains, where 35 were isolated from calves with diarrhea and no *E. coli* were positive for the FC K99, F41 and EAF. About the toxin genes, the most frequent was VT1 in 43 strains, being 24 of diarrheic origin and 19 from healthy calves. Forty strains were EAST1, with of them 17 isolated from diarrheic calves, ten strains were VT2, being six isolated from healthy calves. Eight strains were Ehly, six CDT, four CNF2 and only two strains LT-II. Twenty *E. coli* showed association of *eae*/VT1 and 13 are CS31A/VT1 positive. No strains were positive for STa, Hly and CNF1. The production of VT and Ehly were positive in *in vitro* assays. Eleven strains were negative for all the genes probes. We detected 35 serogroups between *E. coli* studied. To our knowledge, this is the first description of an association between CS31A and VT1. The association between *eae* gene and VT1 toxin show that calves should be considered VTEC reservoir in Brazil for human infection.

1. Introdução

1.1. Diarréia e disenteria em bezerros

A diarréia em bezerros jovens (primeiras três semanas após o nascimento) é um sintoma clínico muito comum, envolvendo a interação de um ou mais microrganismos patogênicos (agentes bacterianos, virais ou protozoários), o sistema imune do animal e um ou mais fatores ambientais, como o tipo de alojamento dos animais, a alimentação e as condições de higiene a que são submetidos. Estudos realizados pelo Departamento de Agricultura nos Estados Unidos no final da década de 70 estimaram que patógenos entéricos matavam a cada ano cerca de 25% dos bezerros nascidos no país. Estimativas mais recentes consideram que a taxa de mortalidade total de bezerros durante o período neonatal oscila, de um ano para outro, entre 5 e 10% e em uma fazenda individual a taxa pode variar de 3 a 30% (Garcia *et al.*, 1999). As diarréias agudas são a principal causa da mortalidade neonatal em bezerros, estimando-se que sejam responsáveis por aproximadamente 75% das mortes de bezerros menores de três semanas de idade (Garcia *et al.*, 1999).

Observações de campo sugerem que as enfermidades que afetam os bezerros durante os três primeiros meses de vida podem acarretar seqüelas para longo prazo. Assim, há sugestão de que bezerros que sobreviveram a episódios clínicos de diarréia podem estar afetados por alguns efeitos residuais mais prolongados sobre o crescimento, a eficácia produtiva e a produção de leite. Um exemplo é um estudo realizado por Waltner-Toews e colaboradores em 1986 em 34 granjas de produção de leite, verificando a probabilidade de atraso no primeiro parto de novilhas tratadas contra diarréia. O primeiro parto normal de uma novilha se dá entre os 22 e 24 meses de

vida. Quando tratadas contra diarreia, verificou-se que a chance de nascimento dos bezerros depois dos trinta meses de vida triplicou.

É estimado que *Escherichia coli*, rotavírus, coronavírus e *Cryptosporidium* spp juntos sejam responsáveis por 75 a 95% de todos os casos de diarreia em bezerros, em todo o mundo. Nos últimos anos, *E. coli* Verotoxigênica (VTEC) tem sido associada à diarreia e disenteria em bezerros de duas a oito semanas de idade (Butler & Clarke, 1994).

O reconhecimento de *E. coli* como um patógeno gastrointestinal é recente. Contudo, *E. coli* é encontrada como membro integrante da microbiota de mamíferos e eventos de transferência gênica horizontal têm mostrado que amostras de *E. coli* comensais se tornaram patogênicas, geralmente pela aquisição de ilhas de patogenicidade (Clarke, 2001).

A colibacilose entérica representa uma das mais comuns síndromes e muito raros são os casos de colapso e morte de animais. A primeira descrição de *Escherichia coli* como agente causador de diarreia foi feita por Smith & Halls em 1967 envolvendo *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) como a causa de diarreia em bezerros. Este fato mostra que ETEC tem um envolvimento etiológico na colibacilose entérica (Butler & Clarke, 1994). Há também uma ação sinérgica entre infecções por ETEC e rotavírus em bezerros. Experimentalmente, a maioria dos estudos comprovam a existência deste sinergismo. Hess e colaboradores em 1984, em estudo mais detalhado realizado sobre a ação sinérgica entre ETEC e rotavírus, comprovaram que, bezerros livres de patógenos quando infectados com ETEC não apresentaram sintomas clínicos e a infecção única com rotavírus ocasionava uma ligeira diarreia. A infecção simultânea com ambos os agentes levava a uma diarreia grave.

No início dos anos 80 uma nova classe de *E. coli* causadoras de diarreia em bezerros foi identificada como *E. coli* produtoras de verotoxina (VTEC).

A evolução no estudo do envolvimento de *E. coli* em doenças entéricas de bezerros tem sido paralela a pesquisas similares feitas com outros animais, incluindo seres humanos (Butler & Clarke, 1994) e vários grupos de *E. coli* vêm sendo associados também à diarreia em bezerros. Os principais grupos são: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC), *Escherichia coli* necrotoxigênica (NTEC), *Escherichia coli* causadora de lesão Attaching and Effacing e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

1.2. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

Doenças entéricas causadas por ETEC são a forma mais comum de colibacilose que ocorre em bovinos e em suínos, podendo também ocorrer em humanos, com menor intensidade em cães e gatos e pouco se sabe sobre a ocorrência de diarreia causadas por ETEC em pássaros ou répteis. A colibacilose que acomete animais de interesse comercial, principalmente na pecuária, é de muito interesse, pois *E. coli* enterotoxigênica e as associadas podem estar intimamente relacionadas com doenças em seres humanos (Nagy & Fekete, 1999).

Segundo Blanco & Blanco (1993) em animais domésticos a colibacilose causada por ETEC é muito freqüente, representando um grande problema em rebanhos de suínos, bovinos e ovinos. Dois atributos caracterizam ETEC: a colonização da porção inferior do intestino e a produção de enterotoxinas, dentre elas a toxina termo-lábil (LT) e a toxina termo-estável (ST) (Nataro & Kaper, 1998). ETEC são comumente encontradas colonizando o intestino delgado de animais recém-nascidos ou muito jovens. Dentre os fatores de colonização relatados como associados à colibacilose bovina destacam-se K99, F41, F17, CS31A, entre outros (Bertin *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1999).

Os de fatores de colonização (fímbrias ou pili) podem variar morfológicamente, biologicamente e antígenicamente entre as linhagens de *Escherichia coli* (Nagy & Fekete, 1999) e um fato interessante é que a resistência à infecção por este grupo de bactérias está relacionada, entre outros fatores, a idade do animal, ou seja, com o avanço da idade a resistência à infecção aumenta (Butler & Clarke, 1994).

A grande maioria das ETEC que podem causar diarreia em bezerros expressa fímbrias K99 (F5) e F41, onde K99 ocupa a posição principal entre os fatores de colonização, mediando a adesão da bactéria na microvilosidade intestinal, sendo que K99 e F41 algumas vezes são produzidos simultaneamente por ETEC. Os receptores para K99 e F41 e mesmo os genes de regulação da expressão são diferentes, sendo que genes de regulação de K99 são encontrados em plasmídios, enquanto que para F41 estão presentes no cromossomo bacteriano (Butler & Clarke, 1994).

A fímbria K99 tem natureza fibrilar, onde a estrutura principal apresenta um sítio ligante de receptor exposto no topo da fímbria. Análise genética mostra que K99 é expresso por um único operon *fan* inserido num plasmídio que apresenta tanto genes de expressão como regulatórios e subunidades menores são necessárias para a montagem da estrutura fímbrial. Seu receptor no enterócito é o Neu 5Gc- α (2-3)Galp- β (1-4)Glc- β (1-1)-ceramida enquanto que o receptor para a fímbria F41 é o N-acetilgalactosamina (Butler & Clarke, 1994).

Outra adesina menos freqüente encontrada em ETEC isoladas de bezerros é a fímbria F17 (anteriormente conhecida como FY ou Att25), que pode ou não estar associada à presença de enterotoxinas. A adesão mediada por esta proteína de superfície é dependente da presença de receptores glicoprotéicos, facilmente encontrados em bezerros e carneiros, que como no caso de K99, vão diminuindo com o avanço da idade. F17 apresentam formas heterogêneas, formando assim uma família de fímbrias F17, baseada na especificidade de receptores, sendo o operon

codificante inserido em plasmídio (Nagy & Fekete, 1999). A família de fímbrias F17 inclui quatro variantes antigênicas (F17a, F17b, F17c e F17d), cuja proteína componente da subunidade principal é codificada por *f17A*, e a adesina responsável em promover a ligação com o receptor nos enterócitos (N-acetil-glucosamina) é codificada por *f17G*, cujas diferenças a afinidade de receptores têm sido observadas em todas as variantes (Contrepois *et al.*, 1998; Mainil *et al.*, 2000).

Outro fator de colonização que poderia estar relacionado a quadro diarréico em bezerros é a adesina afimbrial CS31A. Esta adesina foi descrita pela primeira vez em amostras isoladas de bezerros com septicemia e diarréia e vem sendo associada a estes quadros, diferentemente de K99 e F41. CS31A é geneticamente associada à fímbria K88, expressa por ETEC de suínos, e promove a adesão através do receptor N-acetilneuramínico (Bertin *et al.*, 1998). Sua estrutura antigênica é muito diferenciada de fímbrias típicas e aparenta ter um material capsular ao redor da bactéria. O operon codificante de CS31A *clp* está inserido no cromossomo bacteriano, sendo que *clpG* codifica a subunidade principal da fibrila. Este operon apresenta grande similaridade com o operon codificante de K88 e menor similaridade ao operon de F41. Em estudos realizados anteriormente, antígenos relacionados a CS31A estão sendo encontrados em amostras de *Escherichia coli* isolados de pacientes hospitalizados com casos graves de diarréia e infecções nosocomiais causados por *Klebsiella pneumoniae*, mostrando a possibilidade de transferência horizontal de genes (Bertin *et al.*, 1998). Bertin *et al.* (2000) relatam ainda que uma proteína de 17,5 kDa produzida por uma linhagem referência de CS31A seria uma subunidade estrutural muito semelhante à fímbria F165 presente em *E. coli* isoladas de porcos com septicemia e à fímbria P encontrada em *E. coli* isoladas de humanas com infecções do trato urinário. Este trabalho demonstra que o operon *pap* (codificante da fímbria P) pode estar distribuído entre algumas amostras diarregênicas, sendo o responsável pela colonização da bactéria em sítios

extraintestinais. Além deste fato, o operon *pap* está altamente associado a amostras isoladas de bovinos que produzem CS31A e F17, daí o entendimento de amostras produtoras de CS31A serem também isoladas de septicemia em bezerros.

Além de fatores de colonização, a enterotoxinas têm sido associada a quadros diarréicos causados por ETEC (Blanco & Blanco, 1993; Franck, *et al.*, 1998). Neste sentido, a principal enterotoxina associada a colibacilose causada por ETEC é a toxina termo-estável (ST), principalmente a do tipo I (STa), também associada a ETEC produtoras das fímbrias K99 e F41. A toxina termo-lábil (LT), da variante tipo II (LT-II), vem sendo encontrada também em bezerros com diarréia, mas a sua capacidade de causar diarréia não está comprovada (Nagy & Fekete, 1999).

As ST são pequenas, monoméricas e cujos genes estão inseridos em plasmídios, compreendendo duas classes: toxina termo-estável tipo I (STa) e toxina termo-estável tipo II (STb). O receptor de STa é o guanilato ciclase C (GC-C) e a ligação da toxina no receptor específico induz em aumento dos níveis de monofosfato guanilato cíclico (cGMP), levando à estimulação na secreção de cloro ou à inibição da absorção de sódio com subsequente secreção de fluidos intestinais (Clarke, 2001). STa é uma peptídeo de 18 aminoácidos, com massa molecular de 2kDa e não imunogênico. Seu gene estrutural *estA* está localizado em um plasmídio e está associado a um transposon (Nataro & Kaper, 1998).

Já a toxina STb também é codificada por um gene inserido em plasmídio (*estB*) e este gene expressa um peptídeo de 48 aminoácidos. O receptor de STb não é conhecido, mas ela causa mudanças morfológicas nas vilosidades celulares intestinais (Nataro & Kaper, 1998).

As LT são toxinas oligoméricas e consistem em dois grupos denominados LT-I e LT-II (Nataro & Kaper, 1998). LT-I é relacionada à toxina colérica produzida por *Vibrio cholerae* e é composta por uma subunidade A e cinco subunidades B idênticas que se ligam ao gangliosídeo

GM₁. A subunidade A é responsável pela atividade enzimática da toxina, ativando adenilato ciclase que resulta num aumento de cAMP cíclico intracelular, diminuindo a absorção de sódio e levando a uma diarreia osmótica (Clarke, 2001).

A toxina termo-lábil tipo II (LT-II) apresenta aproximadamente 57% de similaridade com LT-I em relação a subunidade A, mas não apresenta homologia aparente entre as subunidades B. LT-II aumenta o nível de cAMP cíclico intracelular por mecanismos similares ao de LT-I, mas LT-II usa GD1 como receptor ao contrário, de LT-I que utiliza GM1. Não existe evidência que LT-II esteja associada a doenças em humanos ou em animais, mas uma grande porcentagem de ETEC isolada de animais apresenta genes para expressão desta toxina. LT-I está associada a ETEC isoladas de humanos e de alguns animais, não estando por outro lado associada com bovinos (Nataro & Kaper, 1998). Além de adesão e produção de enterotoxinas a patogênese de ETEC também envolve fatores do hospedeiro, sendo o mais importante deles o tipo de receptor para tais fatores de virulência bacterianos.

Muitos outros fatores de virulência ligados a ETEC são conhecidos, porém não é possível dizer o mesmo sobre seus receptores (Nagy & Fekete, 1999).

Em relação aos sorogrupos ligados a ETEC, um número muito limitado pode estar relacionado a ETEC. Segundo Blanco & Blanco (1993) os sorogrupos característicos de ETEC em bezerros são O8, O9, O20 e O101.

1.3. *Escherichia coli* produtoras de lesão “Attaching and Effacing” (AEEC)

Escherichia coli produtoras de lesão “Attaching and Effacing” (A/E) (AEEC) têm sido implicadas em diarreia e disenteria no homem e vários outros animais, incluindo bezerros de duas a oito semanas de idade. “Attaching and Effacing” é um termo usado para descrever uma

lesão intestinal produzida por este tipo de patógeno: “attaching” indica a adesão íntima da bactéria no enterócito; “effacing” está relacionado com a adesão localizada na microvilosidade intestinal.

O mecanismo geral da lesão A/E é caracterizado pela destruição da microvilosidade intestinal, aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal, formação de pedestal e agregação da actina polimerizada e outros elementos no sítio da adesão bacteriana (Nataro & Kaper, 1998).

Os principais genes responsáveis por esta lesão estão inseridos no cromossomo bacteriano, formando uma ilha de patogenicidade denominada “Locus of enterocyte effacement” (LEE). Neste fragmento estão incluídos genes que codificam um sistema de secreção do tipo III e o gene *eae*, que é responsável pela produção da proteína intimina (Nataro & Kaper, 1998).

Tir, uma proteína translocada pelo canal formado pelas moléculas Esp, é inserida na membrana da célula alvo para funcionar como receptor para intimina (Trabulsi *et al.*, 2002). Já a intimina, uma proteína de membrana externa de 94 KDa, é responsável pela adesão íntima entre a bactéria e a membrana do enterócito. As moléculas Esp (EspA, EspB e EspD), produto da secreção do tipo III, estão envolvidas na formação de um canal de ligação entre a bactéria e a célula alvo para transporte de moléculas efetoras e o rearranjo do citoesqueleto de actina do enterócito, formando portanto, um pedestal (China *et al.*, 1999).

Escherichia coli produtoras de lesão A/E abrange dois grupos de *E. coli* diarreogênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (China *et al.*, 1999).

Infecções humanas por EPEC podem ser de origem bovina, que é considerado o maior foco de infecção. EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* patogênico a ser descrito nos EUA associado à diarreia infantil, sendo hoje considerado uma das principais causas de diarreia e morte infantil nos países desenvolvidos (Nataro & Kaper, 1998).

As EPEC, além da ilha de patogenicidade LEE, podem apresentar ainda um plasmídio entre 50-70 MDa chamado “EPEC adherence factor” (EAF). Neste plasmídio está inserida uma sequência de treze genes envolvidos na expressão e montagem de um pili do tipo IV, denominado “bundle-forming pillus” (BFP), (que é responsável pela aderência localizada da bactéria na membrana do enterócito). A expressão e montagem de BFP requerem elementos regulatórios, como a proteína Per e um gene cromossomal *dsbA*, que codificam uma enzima periplasmática que medeia a formação de pontes de dissulfeto (Nataro & Kaper, 1998).

O plasmídio EAF não é essencial para a formação da lesão attaching and effacing, contudo sua presença aumenta a eficiência da lesão, provavelmente pela influência dos genes regulatórios (*per A, B C*) que aumenta a expressão dos genes presentes no locus LEE (Frankel *et al.*, 1998).

Existem amostras de EPEC que não apresentam o plasmídio EAF, as quais são denominadas EPEC atípicas. Deste modo, a diferença básica entre uma EPEC típica e uma atípica é a presença ou não do plasmídio EAF (Trabulsi *et al.*, 2002).

Segundo Albert *et al.*, (1996), algumas linhagens de *E. coli* que apresentam fatores de virulência ligados a EPEC podem produzir uma toxina denominada Toxina Citoletal Distensora (CDT). Contudo, a associação de CDT com o quadro de diarreia não está ainda muito clara (Clarke, 2001).

Os sorogrupos de EPEC relacionados com quadro de infecção humana são bem caracterizados. Doze deles são reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158. Nestes sorogrupos estão incluídas tanto EPEC típicas como EPEC atípicas, bem como outras categorias de *E. coli* diarregênicas, como *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Trabulsi *et al.*, 2002). Tais sorogrupos também podem ser encontrados em amostras bovinas.

Um outro grupo de *Escherichia coli* causadoras de diarreia, as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), como dito anteriormente, apresentam em seu cromossomo a ilha de patogenicidade LEE, onde está inserido o gene *eae* responsável pela produção de intimina e conseqüentemente, da lesão A/E, porém, EHEC não apresentam o plasmídio EAF, mas possuem genes para produção de verotoxinas, o que as exclui totalmente do grupo das EPEC (Paton & Paton, 1998).

O mecanismo de aderência de EHEC não está muito bem descrito, mas algumas possíveis adesinas têm sido a elas relacionadas. Uma região cromossomal de seis seqüências gênicas (*lpfABC'CDE*), muito semelhante a um operon que codifica uma fímbria de *Salmonella* sorotipo *typhimurium* foi identificado em EHEC do sorotipo O157:H7, bem como genes cromossomais que codificam uma proteína muito semelhante a IrgA de *Vibrio cholerae* que pode conferir poder de adesão em células em cultura (Szalo *et al.*, 2002).

Análises sorológicas deste grupo bacteriano mostram o sorotipo O157:H7 considerado como o mais virulento e também o mais comum envolvido em quadros de Colite Hemorrágica (HC) e Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) em humanos. Blanco *et al.* (2001) ressaltam os sorogrupos O103, O118 e O145 como patógenos emergentes causadores de HUS. No Brasil, infecções humanas por O157:H7 têm sido restritas a diarreias não sanguinolentas, particularmente em crianças muito jovens. Contudo, O157:H7 tem sido identificada em animais, inclusive no rebanho bovino. Cerqueira *et al.* (1999) foram os primeiros a verificar O157:H7 em *E. coli* isoladas de bovinos no Rio de Janeiro, Brasil. Moreira *et al.* (2003) encontraram 67% das amostras de *E. coli* isoladas no Sul do Brasil como O91 e O157. Recentemente, Irino *et al.* (2005) encontraram O157:H7 estudando amostras de *E. coli* isoladas de bovinos em São Paulo.

1.4. *Escherichia coli* produtoras de toxinas

1.4.1. *Escherichia coli* produtoras de verotoxinas (VTEC e EHEC)

E. coli verotoxigênica se refere a todas as amostras capazes de produzir toxinas que apresentam efeito citotóxico em células Vero em cultura: *Escherichia coli* produtoras de Verotoxina (VTEC) e *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). Podem produzir dois tipos de verotoxinas, VT1 e/ou VT2. A Verotoxina tipo 1 (VT1) é funcional e estruturalmente relacionada com a Toxina de Shiga sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo I. VT1 e VT2 também são conhecidas como Toxina Shiga-like (Stx) (Orden, 2002). VT1 e VT2 apresentam aproximadamente 60% de homologia de DNA e são imunologicamente distintas (Agbodage, 1999).

Kaper *et al.* (2004) relatam que amostras produtoras de VT são consideradas como VTEC e, se além de apresentarem genes para esta toxina apresentarem LEE em seu cromossomo, são consideradas então EHEC.

A Verotoxina foi descoberta pela primeira vez em *E. coli* em 1977 por Konowalchuk *et al.* (1977), observando filtrados de sobrenadantes bacterianos em ensaios de citotoxicidade em células Vero (células de rim de macaco verde africano).

As VTs são holotoxinas de aproximadamente 70 kDa, onde a subunidade A (32 kDa) é catalítica e uma subunidade B pentamérica (aproximadamente 7,7 kDa por monômero) se liga ao receptor dos enterócitos. Uma vez ligada, a toxina é internalizada por processo de endocitose e vesículas contendo a toxina são formadas. Em algumas células há a fusão das vesículas com o lisossoma e a toxina é degradada. Em outras, a toxina é processada via complexo de Golgi e retículo endoplasmático, onde a subunidade A é quebrada por uma protease gerando dois fragmentos, A1 e A2, de 27 e 4 kDa, respectivamente. A subunidade A1 tem atividade RNA N-

glicosidase, que cliva a porção 28S ribossomal da célula alvo. Esta clivagem inibe a ligação de amino acil-tRNA na porção 60s ribossomal, inibindo a síntese protéica da célula (Paton & Paton, 1998; Law, 2000). VT1 e VT2 ligam-se ao receptor globotriosilceramida (Gb3) da célula eucariótica, resultando em efeito citotóxico. Portanto, a diarreia sanguinolenta se dá não por alteração osmótica dos enterócitos, e sim pela destruição da camada de células absortivas presentes no epitélio intestinal (Agbodaze, 1999).

Os genes que codificam VT estão inseridos no cromossomo bacteriano através de fagos temperados, sendo um único operon que apresenta estruturas comuns, constituindo de apenas uma unidade transcricional, codificando primeiro a subunidade A e depois as subunidades B (Paton & Paton, 1998).

Em diversos países, quando analisados os sorogrupos prevalentes ligados a VTEC, observa-se uma grande diversidade de sorotipos. Mais de 125 diferentes sorogrupos têm sido observados, porém com um número limitado frequentemente relacionados a amostras de VTEC (O2, O5, O8, O20, O22, O26, O45, O82, O91, O103, O116, O153, O156, O171, O172, O174) comumente encontrados em bezerros em diferentes países (Blanco *et al.*, 2001).

Um outro fator que pode também aumentar a virulência de VTEC, além da expressão de VT, é a produção de uma hemolisina denominada Enterohemolisina (hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica, Ehly), codificada por genes inseridos em um plasmídio de aproximadamente 60 MDa (Blanco *et al.*, 2001). Enterohemolisina caracteriza-se por produzir pequenas zonas de hemólise (hemólise tipo α ou parcial) após 24-48 hs de incubação quando inoculadas em ágar contendo hemácias previamente lavadas, diferentemente da α -hemolisina de *E. coli*, que apresenta hemólise total (do tipo β ou completa) após 4 horas de incubação, e ainda, sem a necessidade de serem inoculadas em meios de cultura com hemácias previamente lavadas (Law, 2000).

O envolvimento da Ehly com doenças intestinais ainda não está muito bem determinado e também é desconhecido seu papel em infecções humanas, pois não há relatos sobre o envolvimento de Ehly com casos de HUS e HC. Porém existem indícios de que a relevância desta toxina na infecção animal seja importante. Contudo, o operon *ehx* é altamente conservado, levando a crer de que a toxina tenha papel fundamental no poder infeccioso de VTEC (Law, 2000).

Há uma sugestão de que a Ehly poderia aumentar o potencial citotóxico da Verotoxina e poderia ser considerado também um marcador de diagnóstico de VTEC numa infecção intestinal (Nataro & Kaper, 1998; Leomil, *et al.*, 2003). Investigações em vários países na Europa, Ásia e América do Norte mostram que 10 a 80% dos bezerros estão infectados por VTEC, mas no Brasil esta porcentagem ainda é desconhecida. E ainda, amostras produtoras apenas de VT1, e que possuem o gene *eae* necessário para causar a lesão A/E, são atributos suficientes para causar diarreia em bezerros (Leomil *et al.*, 2003).

Nas EHEC, além da produção de VTs e de Ehly, outros fatores de virulência estão associados, como a presença de LEE (Blanco *et al.*, 2001). EHEC não carregam o plasmídeo EAF (*E. coli* adherence factor), não codificando, portanto, o pilus tipo IV BFP (bundle forming pillus) (Paton & Paton, 1998).

O mecanismo exato de adesão destes patógenos (EHEC) ainda é incerto e estudos mais aprofundados seriam necessários para se avaliar o envolvimento da intimina neste processo de adesão, e de possíveis outros mecanismos ainda não conhecidos por parte do grupo das EHEC (Law, 2000). Estão sendo descritas algumas adesinas que podem ter papel importante na adesão desta bactéria. A adesina ToxB, codificada por um plasmídeo de 93kb, está presente em EHEC O157:H7 e em outros sorotipos. Esta proteína apresenta seqüência muito semelhante à família de toxinas de *Clostridium*, proteína LifA de EPEC e proteína Efa-1, que estão sendo consideradas

adesinas expressadas por EHEC (Kaper *et al.*, 2004). Este plasmídio também codifica toxinas RTX, que são similares à hemolisina de *E. coli* Uropatogênica, EspP protease e proteína StcE. Esta última cliva o inibidor de protease C1 da via do complemento e pode contribuir potencialmente para o dano no tecido alvo, edema e anormalidades características de infecções por EHEC (Kaper *et al.*, 2004).

Porém, EHEC também apresenta outros fatores de virulência que podem ser considerados marcadores para a distinção entre EHEC e VTEC, como a produção da proteína EspB e da proteína autoaglutinante (Saa) (Paton *et al.*, 2001).

No Brasil, poucos são os relatos e não se sabe ao certo sobre a ocorrência de EHEC isoladas de bezerros com ou sem diarreia. E ainda, a prevalência de VTEC e EHEC entre as *E. coli* isoladas de quadro diarreico no rebanho bovino brasileiro também não está totalmente descrita.

Há indícios de que VTEC e EHEC são amplamente distribuídas no intestino de bezerros, porcos, carneiros, búfalos e seus produtos derivados, como leite e carne (Agbodaze, 1999). Animais domésticos, principalmente bezerros, são considerados como o principal reservatório de VTEC potencialmente infecciosa para seres humanos. A transmissão ocorre no consumo de derivados destes animais (leite e carne) ou através da água contaminada por fezes destes carreadores, uma vez que VTEC são encontrados como parte da sua microbiota (Blanco *et al.*, 2001). O reconhecimento de VTEC e EHEC como agente etiológico de doença representa um dos mais importantes avanços no estudo de patógenos entéricos. Vale salientar o fato de que *E. coli* verotoxigênicas (VTEC e EHEC) não são apenas agentes casuais de diarreia em algumas áreas geográficas, mas também agentes significantes de duas enfermidades importantes para animais e seres humanos, como a Colite Hemorrágica (HC) e Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) (Agbodaze, 1999).

1.4.2. *Escherichia coli* produtoras de Fator Necrosante Citotóxico (NTEC)

Escherichia coli necrotoxigênica (NTEC) é uma categoria emergente de bactérias potencialmente patogênicas. Estão definidas tendo como base a produção de uma ou mais toxinas denominadas CNF (fator necrosante citotóxico), tipo 1 ou tipo 2 (CNF1 e CNF2) (Van Bost *et al.*, 2001). Estas toxinas foram assim denominadas por possuírem a capacidade de causar necrose em pele de coelhos, serem letais a ratos e induzirem a multinucleação de células Vero e HeLa em cultura (De Rycke & Plassiart, 1990; Van Bost *et al.*, 2001). Dois tipos diferentes de CNF têm sido relatados: CNF1 e CNF2. Linhagens produtoras de CNF1 vêm sendo encontradas causando enterites em ruminantes, porcos, cães, coelhos e cavalos e infecções extra-intestinais em porcos, cães, gatos e em humanos (De Rycke *et al.*, 1999). Linhagens produtoras de CNF2 são isoladas freqüentemente de ruminantes com infecções intestinais e septicemias (Van Bost *et al.*, 2001).

Amostras NTEC produtoras de CNF1 têm sido associadas com infecções extraintestinais humanas. Amostras NTEC produtoras de CNF2 podem ser isoladas de fezes de uma porcentagem representativa de bezerros saudáveis. Portanto, a associação de NTEC com o quadro diarréico de bezerros jovens é muito questionada (Orden *et al.*, 1999).

CNF1 e CNF2 são proteínas monoméricas, de 110 a 115KDa, tendo seu mecanismo de ação recentemente elucidado. Induzem a desamidação da glutamina 63 da proteína alvo RhoA da célula eucariótica, produzindo um resíduo glutamato, aumentando o stress da célula alvo e resultando em aumento de tamanho e geralmente, morte celular (Nataro & Kaper, 1998). O modo de ação na geração da diarréia ainda não está esclarecido (Nataro & Kaper, 1998).

Os genes de CNF1 estão localizados no cromossomo bacteriano, no mesmo operon que estão inseridos os genes de expressão de alfa-hemolisina (α -Hly) que, com outros genes de

virulência caracterizam a ilha de patogenicidade denominada Pai 5 (De Rycke *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001). Muitas são as hemolisinas produzidas por *E. coli*. As hemolisinas clássicas (do tipo alfa ou beta) são ativas quando testadas em meios de cultura contendo sangue (Agar Sangue) (Mainil *et al.*, 1999).

CNF2 foi identificada como uma toxina Vir de *E. coli*, pois os genes responsáveis pela produção da toxina estão inseridos no plasmídeo Vir. Contudo, os genes responsáveis pela produção de CNF1 estão inseridos no cromossomo bacteriano (Van Bost *et al.*, 2001). Outros genes para fatores de virulência estão inseridos no plasmídeo Vir, como os genes que expressam a fímbria F17, bem como seus subtipos que compõem a família F17, mas nem todas as amostras que apresentam tal plasmídeo e produzem CNF2, podem produzir a adesina.

Amostras NTEC podem apresentar ainda outros fatores de virulência. A toxina termo-lábil tipo 2 (LT-II) e a Toxina termo-estável de *E. coli* Enteroagregativa 1 (EAST1) estão associadas a NTEC. NTEC produtora de CNF1 pode expressar fímbria P e S e ainda adesina AFA e CS31A. NTEC produtoras de CNF2 podem expressar além de F17, adesina AFA (Bertin *et al.*, 1998; Mainil *et al.*, 1999).

Genes responsáveis pela expressão de um subtipo de CDT (toxina citoletal distensora), denominado CDT-III, estão também inseridos dentro do plasmídeo Vir, que pode, portanto ser produzida tanto por amostras caracterizadas como NTEC como por amostras EPEC descritas há pouco (Orden *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001).

CDT foi descrita pela primeira vez em *E. coli* em 1987 por Johnson e Lior como uma nova toxina entérica. Mais tarde, mostrou-se que a atividade de CDT era similar a toxina produzida por alguns patógenos como *Shigella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Actiobacillus*, entre outros (De Rycke & Oswald, 2001; Pickett & Whitehouse, 1999).

A estrutura genética de CDT está organizada em um único operon que inclui três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, que codificam proteínas com massa molecular deduzida de 27, 29, e 20 KDa, respectivamente.

A expressão dos três genes é necessária para a atividade de CDT (De Rycke & Oswald, 2001). Estudo recente mostra que os genes de CDT são carreados por bacteriófagos, que podem ser inseridos tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídios (Janka *et al.*, 2003). Em modelo animal (camundongo) a CDT foi associada a uma rápida secreção intestinal e a diarreia observada após 4 horas da inoculação (Okuda *et al.*, 1997). A relação do efeito no modelo animal com doença no homem e animais ainda é desconhecido, sendo os principais efeitos desta toxina a capacidade de bloquear o ciclo celular entre a fase G2 e M da célula hospedeira, causando posteriormente distensão celular e lise. Este evento pode sugerir que CDT seja capaz de induzir alguma alteração genômica, pois CDT-B apresenta alguma homologia com enzimas fosfodiesterases (De Rycke & Oswald, 2001). As proteínas CDT-A e CDT-C são consideradas proteínas acessórias, mediando a ligação de CDT no receptor da célula alvo e são considerados como fatores importantes na intoxicação, mas esta propriedade ainda não está muito bem elucidado (Pickett *et al.*, 2004).

Quatro variantes genéticas CDTI, CDTII, CDTIII e CDTIV, têm sido identificadas em *E. coli*. Recentemente, Bielaszewska *et al.* (2004) identificaram uma nova variante genética de CDT em amostra VTEC O157:H-, denominada então de CDTV. Estudos mostram que existe uma incidência maior das variantes I e II em amostras isoladas de humanos e CDTIII mais prevalente em amostras isoladas de bezerros. Não existe ainda uma clareza na prevalência ou incidência de CDTIV em amostras isoladas de origem animal ou de seres humanos, o mesmo pode ser dito no que diz respeito ao quadro diarréico causado por tal variante protéica (Clark *et*

al., 2002; Van Bost *et al.*, 2001). O papel de CDTV e também sua incidência em *E. coli* isoladas de bovino ainda não está esclarecida.

NTEC 1 também pode produzir CDT, mas não a variante tipo III. Há indícios de que uma nova variante de CDT (CDTIV) poderia estar sendo produzidas por amostras CNF1 positivas (Mainil *et al.*, 2003).

A ação e interação de CNF e CDT têm sido descritas (Pickett & Whitehouse, 1999). CNF causa a reativação da síntese de DNA e do ciclo celular e a ocorrência do stress das fibras de actina. CDT é responsável pelo bloqueio da mitose na fase G2/M. Contudo, CDT só exerce sua função novamente se a célula alvo entrar na fase S do ciclo celular. Então é necessária a ativação de CNF para o efeito acontecer. O sinergismo entre CNF e CDT causa alterações funcionais na vilosidade intestinal, inibindo a renovação celular, induzindo a fagocitose e facilitando a invasão do microrganismo no tecido alvo podendo causar diarreia (Mainil *et al.*, 2003).

1.5. *Escherichia coli* Enteroagregativas (EAEC)

E. coli Enteroagregativa (EAEC) são membros das *E. coli* diarreogênicas, reconhecidas como patógenos emergentes de diarreia, atingindo principalmente crianças dos países subdesenvolvidos como Índia, Brasil, México, Chile e Irã (Nataro & Kaper, 1998).

Muitos são os fatores de virulência ligados a EAEC, como a fímbria de aderência agregativa tipos I e II (AAF/I e AAF/II, respectivamente), plasmídeo codificante de toxina (Pet), várias hemolisinas (Hly), proteínas de membrana externa e uma enterotoxina designada Toxina termo-estável de EAEC tipo 1 (EAST1). Estudos sugerem existir maior número de adesinas envolvidas no fenótipo agregativo das amostras (Law & Chart, 1998; Navarro-Garcia *et al.*, 1998).

EAST1 é um peptídeo enterotóxico termo-estável de baixo peso molecular que foi primeiramente descrito por Savarino *et al.*, (1991). EAST1 é codificado pelo gene *astA*, uma seqüência de 117 pares de base encontrada tanto em plasmídeo como inserido no cromossomo bacteriano, algumas vezes em ambos, com uma ou mais cópias numa mesma bactéria (Ménard *et al.*, 2004). Este gene codifica um peptídeo de 38 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 4.1KDa. Por se tratar de uma toxina de peso molecular muito baixo, que também ativa o cGMP na célula intestinal alvo, EAST1 é comparada à toxina STa produzida por *E. coli* Enterotoxingênicas (ETEC). Contudo, EAST1 apresenta apenas 50% de homologia quando comparada a STa e não é neutralizada por antissoros produzidos contra a toxina termo-estável (Ménard *et al.*, 2004).

Muitos são os sorogrupos e sorotipos associados a EAEC, apesar de muitas amostras não apresentarem antígenos O tipáveis e serem imóveis. Mais de 90 sorotipos diferentes são encontrados em EAEC, sendo muitos deles característicos de EPEC e ETEC como O44, O86, O111, O126 e O128 (Law & Chart, 1998).

Estudos epidemiológicos demonstraram que EAST1 não está apenas associada a EAEC, mas também está presente em quase todos os grupos de *E. coli* causadoras de diarreia e alguns outros patógenos entéricos. Foram encontradas amostras que não possuíam outro fator de virulência a não ser EAST1 em fezes de humanos, bezerros e porcos, inclusive em animais saudáveis, estudos tentam mostrar, no entanto, que EAST 1 sozinha não é capaz de causar doença em seres humanos (Law & Chart, 1998, Ménard *et al.*, 2004).

Existem vários estudos mostrando a evolução da *Escherichia coli* como um grande patógeno gastrointestinal, no que diz respeito à transferência horizontal de genes, que traz como consequência diversidade biológica quanto aos seus fatores de virulência. Estudos comprovam que amostras isoladas de animais saudáveis podem ser potencialmente patogênicas para seres

humanos, por possuírem fatores de virulência característicos para tal hospedeiro, mostrando ser um grande risco para a saúde pública.

No Brasil, o rebanho de bovinos cresce a cada dia e a necessidade de estudos mais aprofundados no que diz respeito a colibacilose bovina é cada vez mais importante, pois bezerros são considerados por muitos autores como reservatórios para patógenos humanos e o consumo de derivados destes animais podem se tornar um risco a população.

Por estes motivos, este trabalho tem por objetivo caracterizar as amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos com e sem diarreia quanto a seus fatores de virulência e sorogrupos, tentando mostrar se o rebanho brasileiro em uma determinada região do país pode ser considerado de risco para o consumo da população.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar 101 amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia quanto à:

- Presença dos genes de fatores de colonização K99, F41, CS31A e F17;
- Presença dos genes de toxinas STa, LT-II, CNF1, CNF-2, VT1 e VT2, EAST1, CDT III e Ehly;
- Presença do gene *eae* e do plasmídeo EAF;
- Determinação dos sorogrupos (antígenos O);
- Expressão de Hemolisina e Enterohemolisina;
- Detecção da atividade da Verotoxina e,
- Detectar uma possível associação entre os fatores de colonização e toxinas entre as amostras estudadas.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras de campo

Neste trabalho foram analisadas amostras de *Escherichia coli* originárias de bezerros, sendo 58 delas isoladas de 29 bezerros com diarreia e outras 43 isoladas de 21 bezerros sem diarreia em fazendas de gado leiteiro. As amostras já identificadas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Halha O. Saridakis, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR. Os bezerros apresentavam de três dias a quatro meses de idade em período pré desmame da região norte do estado do Paraná, Brasil. As amostras foram semeadas em Agar MacConckey e as colônias características de *E. coli* foram então semeadas em Meio de Estoque (Agar Nutriente e Caldo Nutriente) para preservação.

3.2. Amostras padrão

Utilizou-se como controle positivo para as reações de PCR as amostras padrão de *E. coli* a seguir:

- **F41, K99, STa**: B41 (O101:K-)
- **F17**: B62
- **CS31A**: 31A
- **LT-II**: Pc/c LT-II
- **CNF1**: MR 48 (O75:K95)
- **CNF 2**: B26a (O123:H16)
- **CDT**: CDT III (O128:H-)
- **EAF**: FV176 (O114:H2)
- **Hly**: FVL 16 (O6:K13:H1)

- **VT1 / VT2:** 152–2(5)(O157:H7)
- **EAST1:** FV171: (O44)
- **Ehly:** C3888: Ehly+
- **eae:** 2348/69
- DH5 α : controle negativo.

3.3. Obtenção do DNA bacteriano

As amostras padrão e de campo foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI - Difco) a 37°C por 18 horas e, em seguida, semeadas em ágar triptonso soja (TSA – Difco) e novamente incubadas a 37°C por 18 horas. Do crescimento bacteriano em placa, foi retirado um raspado que foi ressuspensão em 100 μ L de água Milli-Q previamente esterilizada. O produto foi homogeneizado em vórtex e submetido à lise térmica (fervura) durante 10 minutos e, em seguida, centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Sorvall MC 12). Os sobrenadantes com o DNA bacteriano foram utilizados nos ensaios da PCR (Blanco *et al.*, 1997b).

3.4. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a detecção e amplificação dos genes de interesse foram utilizados para cada reação:

| Componentes | Volume (μ L) | Concentração Final |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|
| 10x “PCR Buffer” (Gibco-BRL) | 3 μ L | 1x |
| 10mM “dNTP mixture” (Gigco – BRL) | 0,6 μ L | 0,2mM |
| Par de Iniciadores | - | 50 pmol |
| 50 mM MgCl ₂ (Gibco – BRL) | 1,5 μ L | 1,5 mM |
| DNA bacteriano | 7 μ L | - |
| Taq – DNA polymerase (5U)(Gibco-BRL) | 0,2 μ L | 1U |
| Água Milli-Q esterilizada | qsp (30 μ L) | - |
| Total | 30 μ L | - |

As sequências dos pares de iniciadores estão descritas no Quadro 1. As reações de amplificação foram realizadas no Termociclador (Applied Biosystems – GeneAmp – PCR System 9700), onde foram submetidas a 94°C por cinco minutos, 35 ciclos de 94°C por um minuto, temperatura de anelamento específicas descritas no Quadro 2 por um minuto e a 72° C por dois minutos.

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas como iniciadores para ensaios da PCR e tamanhos (pb) expressados por amplificados.

| Gene | Sequência (5' – 3') | Produto amplificado (pb) | Referência bibliográfica |
|-------------|--|---------------------------------|-------------------------------------|
| K99 | TGG GAC TAC CAA TGC TTC TG TAT CCA CCA TTA GAC GGA GC | 450 | Roosendaal <i>et al.</i> , 1984. |
| F41 | GAG GGA CTT TCA TCT TTT AG AGT CCA TTC CAT TTA ATG GC | 431 | Fidock <i>et al.</i> , 1989. |
| CS31A | GGG CGC TCT CTC CTT CAA C CGC CCT AAT TGC TGG CGA C | 402 | Bertin <i>et al.</i> , 1998. |
| F17 | GCA GAA AAT TCA ATT TAT CCT TGG CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC | 537 | Bertin <i>et al.</i> , 1996. |
| STa | TCC GTG AAA CAA CAT GAC GG ATA ACA TCC AGC ACA GGC AG | 244 | So & McCarty, 1980. |
| LT-II | AGA TAT AAT GAT GGA TAT GTA TC TAA CCC TCG AAA TAA ATC TC | 300 | Schultsz <i>et al.</i> , 1994. |
| CDT III | GAG TTA TTC CTT CCC CAG GC CAA AGG CAT CAA CAG CAG AA | 108 | Silva & Leite, 2002. |
| VT1 | AAG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G | 364 | Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994. |
| VT2 | GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA GTA TCT GCC TGA AGC GTA A | 386 | Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994. |
| Ehly | GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T | 534 | Paton & Paton, 1998. |
| EAF | CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA | 397 | Gunzburg <i>et al.</i> , 1995. |
| CNF1 | GAA CTT ATT AAG GAT AGT CAT TAT TTA TAA CGC TG | 543 | Blanco <i>et al.</i> , 1996. |
| CNF2 | AAT CTA ATT AAA GAG AAC CAT GCT TTG TAT ATC TA | 543 | Blanco <i>et al.</i> , 1996. |
| EAST1 | CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT | 111 | Yamamoto & Echeverria, 1996. |
| <i>Eae</i> | GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG | 384 | Yu & Kaper, 1992. |

Quadro 2. Temperaturas de anelamento para iniciadores dos fatores de virulência pesquisados por PCR.

| Fator de Virulência | Temperatura de Anelamento (°C) |
|---|---------------------------------------|
| CDT, LT-II, CS31A, K99, F41, STa | 48 |
| F17 | 62 |
| CNF1 e CNF2 | 43 |
| VT1 e VT2 | 54 |
| EAST1 | 50 |
| <i>eae</i> | 51 |
| Enthlhy e EAF | 50 |

Após os ciclos, as reações foram submetidas a 72°C por sete minutos para extensão final. Para a visualização dos resultados, 10µL do produto da PCR foram misturados com 4µL do tampão de amostra para corrida de eletroforese (tampão TAE acrescido de 25% Ficoll ou sacarose, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% Xileno cianol) que foram aplicados em gel de agarose horizontal a 2%, preparados com tampão TAE (Tris 1,6M, EDTA 0,025M, ácido acético, 0,8M pH 7,9).

A corrida eletroforética foi realizada por 45 minutos a 100 volts. Em seguida, o gel foi submerso em solução de brometo de etídeo (1,5µg/ml) por 10 minutos. As bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta e fotografadas no sistema Image Máster VDS (Pharmacia Biotech Inc. USA).

3.5. Ensaios para a detecção de Hemolisina e Enterohemolisina em amostras de *E. coli*

Para a detecção da produção de hemolisina as amostras padrão e as de campo foram semeadas em caldo BHI e incubadas a 37° C/18 hs e, em seguida, semeadas em Ágar Sangue contendo 5% de hemácia bovina não lavadas e incubadas por 24h a 37° C. Foram consideradas hemolisina positivas quando observado um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano, com hemólise do tipo α (ou parcial) ou do tipo β (ou total).

Para a detecção da Enterohemolisina, as amostras também foram cultivadas em Ágar Sangue preparado com 5% de hemácias previamente lavadas com PBS (sangue bovino) (Beutin *et al.*, 1988) e incubadas a 37° C por 24hs. Neste caso as amostras capazes de efetuar hemólise tipo α foram consideradas positivas.

3.6. Detecção da atividade da Verotoxina em ensaios de citotoxicidade celular

3.6.1. Preparo das amostras

As amostras de *E. coli* padrão e de campo foram cultivadas em 2 ml de meio líquido TSB (Tryptic Soy Broth – Difco) a 37°C com agitação a 250 rpm por 18 horas. O crescimento bacteriano obtido foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. em centrífuga refrigerada com rotor para microtubos de 1,5ml. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi armazenado a 4°C até o momento do experimento.

3.6.2. Preparo da linhagem celular

As células Vero (Células de Rim de Macaco Verde Africano) foram descongeladas e cultivadas em garrafas com Meio Mínimo Essencial Eagle (MEM) contendo 10 % de soro fetal

bovino (SFB), 100 UI de penicilina/ml e 10 mg/ml de estreptomicina, e incubadas a 37°C em estufa a 5% de CO₂ para a formação de uma monocamada celular.

Para o teste de citotoxicidade, as células foram submetidas à ação da tripsina para o desprendimento da monocamada e, em seguida, foram preparadas microplacas de fundo chato com 96 poços contendo 100µL de MEM Eagle com 10% de SFB, 100 UI de penicilina/ml e 10 mg/ml de estreptomicina com aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/ml.

Após 24 horas a 37°C em estufa a 5% de CO₂, o meio de cultura foi substituído por 100µL de MEM Eagle com 2% de soro fetal bovino contendo diluições a 1:4 e 1:8 dos sobrenadantes das amostras em estudo. As placas foram então incubadas a 37°C em estufa a 5% CO₂ e as alterações morfológicas das células foram observadas em microscópio invertido após 24 e 48 hs de incubação.

3.7. Determinação dos Sorogrupos

Para a determinação dos antígenos O (sorogrupagem), a metodologia utilizada foi baseada em Guinée *et al.* (1972) e modificado por Blanco *et al.* (1992). As amostras de campo foram semeadas em ágar triptona soja (TSA) e incubadas a 37°C por 24 hs. Do crescimento bacteriano em placa foi obtido um raspado bacteriano que foi suspenso em dois tubos contendo 2 ml de NaCl 0,15M até a concentração de $1,8 \times 10^9$ baseando-se na Escala 6 de MacFarland. Após um tubo ser submetido à lise térmica (fervura) por uma hora e o outro autoclavado por 2,5 horas, para as amostras que continuaram em suspensão foram acrescidos 2 ml de NaCl 0,15M formalizada 0,5%, adicionado de solução de Violeta Genciana 0,005%.

Para determinação dos sorogrupos, cada suspensão bacteriana foi testada frente aos antissoros O específico (O1 até O175) por reação de aglutinação em microplaca de poliestireno de fundo V.

Cada poço da microplaca recebeu 50µL da amostra em teste e 50 µL de antissoro diluído (1:80). A placa foi incubada a 37°C/18h em câmara úmida. Para padrão negativo de leitura, utilizou-se um poço com 50µL de amostra e 50µL de NaCl 0,15M. As amostras que não apresentaram um depósito (botão) no fundo do poço foram consideradas como positivas.

3.8. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos no trabalho foi utilizado o teste de proporções entre os dois universos estudados (amostras isoladas de bezerros com diarreia e amostras isoladas de bezerros sadios). Considerando H_0 como hipótese nula e H_1 como hipótese não nula, foi considerado o resultado obtido na fórmula a seguir:

$$Z = (p_1 - p_2) / \sqrt{p(1-p) / (1/n_1 + 1/n_2)} , \text{ sendo}$$

p: no. total de amostras positivas/ no. total de amostras estudadas;

p_1 : no. total de amostras positivas/ no. de amostras isoladas de bezerros com diarreia;

p_2 : no. total de amostras positivas/ no. de amostras isoladas de bezerros sem diarreia;

n_1 : universo de amostras isoladas de bezerros com diarreia;

n_2 : universo de amostras isoladas de bezerros sadios;

considerando $\alpha_{0,005/2} = 1,96$, rejeitar H_0 quando $Z \geq 1,96$.

4. Resultados

4.1. Detecção de Fatores de Colonização (FC)

Foram analisadas 101 amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia, sendo detectados Fatores de Colonização (FC) estudados em 31 amostras. O gene *eae* foi encontrado em 43 amostras, sendo que 35 amostras eram provenientes de animais com diarreia e oito amostras de animais sadios. Para os demais FC, os resultados foram os seguintes: 26 CS31A+, sendo 24 em animais com diarreia e duas em animais sadios, onze F17+, sendo dez isoladas de bezerros com diarreia e uma isolada de um animal sadio. Destas, seis amostras apresentaram associação CS31A+/F17+, todas de animais de quadros diarreicos (Tabela 1).

Em relação a *E. coli eae+* observou-se as seguintes associações: 11 amostras foram CS31A+, todas de origem diarreica, sendo que três estavam associados a F17 e F17 sem associação a outro FC foi detectado em quatro amostras, todas de origem diarreica. Apenas três amostras apresentaram a associação entre CS31A e F17 entre as amostras *eae+*, todas isoladas de quadro diarreico (Tabela 5).

Vinte e oito amostras não apresentaram outros fatores de colonização a não ser o *eae* (Tabela 5).

Foram detectadas 16 amostras FC+ mas negativas para o gene *eae*, sendo 15 amostras CS31A+, treze delas isoladas de bezerros com diarreia, sendo três delas associadas a F17 e apenas uma F17+ isolada de bezerro sadio (Tabela 6).

Em setenta *E. coli* não foram detectados FC e não foram encontradas amostras positivas para os genes de K99, F41 e EAF. Os resultados obtidos quanto aos fatores de colonização estão descritos na tabela 1.

4.2. Detecção de Toxinas

Nas 101 *E. coli* estudadas, 69 delas apresentaram reação positiva para pelo menos um dos genes de toxinas pesquisados (Tabela 2), sendo 43 amostras VT1+, sendo 24 em animais com diarreia e 19 em animais sadios. Ainda, 40 amostras foram EAST1+, sendo 17 provenientes de animais com diarreia e 23 de animais saudáveis; 10 VT2+, sendo quatro de amostras diarreicas e seis de amostras isoladas de bezerros saudáveis; oito Enthly+, com quatro isoladas de quadro diarreico, seis amostras foram CDT+, quatro CNF2+ e apenas duas LT-II+. Não foram detectadas amostras positivas para os genes das toxinas Hly, CNF1 e STa. As amostras positivas para os genes de toxinas podem ser visualizadas na Tabela 2.

A expressão de VT foi confirmada em ensaios com células Vero para todas as *E. coli* VT positivas, enquanto que a expressão da Ehly também foi confirmada quando semeadas em Ágar contendo hemácias previamente lavadas.

4.3. Determinação dos Sorogrupos

Foram detectados 35 sorogrupos diferentes nas amostras, sendo alguns em maior frequência, como O7 em sete amostras, O23 em cinco amostras, O4, O8, O153 e O156 em quatro amostras cada, O103, O123 e O146 em três amostras cada, O1, O3, O15, O26, O49, O55, O128, O144, O148 e O175 em duas amostras cada. Os demais sorogrupos não houve prevalência entre as amostras estudadas, mostrando a diversidade biológica dos isolados bovinos. Os resultados dos testes de sorogrupos podem ser visualizados na Tabela 3. Os resultados dos sorogrupos, bem como sua distribuição entre as amostras isoladas de bezerros com ou sem

diarréia podem ser visualizados na Tabela 4. Sete amostras apresentaram-se rugosas nos ensaios de sorologia e vinte e uma amostras mostraram-se não-tipáveis (NT).

4.4 Associação entre Fatores de Virulência e Sorogrupos

Das 43 *E. coli eae+*, 35 foram isoladas de bezerros com diarréia e oito isoladas de bezerros sadios. Nestas amostras foram identificados 24 sorogrupos, sendo os sorogrupos mais comuns O123 e O156 (tabela 7). Além disto, a maioria destas amostras associaram-se também com a produção de toxinas, visto que das 43 *E. coli eae+* encontradas, 34 apresentaram um ou mais genes responsáveis pela expressão de toxinas. Vinte amostras foram VT1+, sendo 15 delas isoladas de quadros diarréicos. Entre as amostras *eae+/CS31A+*, observou-se a seguinte distribuição das toxinas: duas amostras VT1+, uma EAST1+, uma VT2+, duas amostras VT1+/EAST1+ e uma VT1+/Enthly+. Quatro amostras foram *eae+/F17+*, sendo que uma estava associada a VT2+, uma associada a CDT+ e CNF2+ e uma associada a EAST1+ e CNF2+.

Das amostras *eae+/CS31A+/F17+*, uma estava associada a VT1 e outra associada a VT1 e EAST1. As amostras de *E. coli* apenas *eae+*, cinco amostras foram VT1+, três amostras EAST1+, quatro VT1+/EAST1+, três VT1+/Enthly+, duas Enthly+, duas CDT+, uma CNF2+, uma EAST1+/Enthly e outra VT1+/CDT+. Seis amostras não apresentaram toxinas. As associações entre fatores de colonização e toxinas entre as amostras *eae+* estão demonstradas nas tabelas 5 e 7.

Entre as *E. coli eae* negativas, verificou-se 25 sorogrupos identificados, sendo mais encontrados os sorogrupos O7 e O4.

Em relação às toxinas estudadas, foram encontradas 40 amostras dentre as 58 amostras *eae* negativas potencialmente capazes de produzir uma ou mais toxinas, sendo que 29 delas

foram isoladas de bezerros sadios. Vinte e três amostras foram VT1 positivas, sendo 14 isoladas de bezerros sem diarreia. Vinte e três amostras foram EAST1+, onde 16 eram provenientes de bezerros sadios. Dentre as amostras CS31A+, observamos cinco amostras VT1+, sendo uma associada a CDT, uma associada a VT2/EAST1 e duas associadas a EAST1. Três amostras apresentaram a associação entre CS31A/F17, sendo que apenas uma amostra produziu toxina VT1. Apenas uma amostra apresentou FC F17+, sendo que também apresentou resultado positivo para EAST1.

Nove amostras deste grupo foram EAST1+, oito amostras VT1+/EAST1+, quatro VT1+ e três amostras VT2+. As demais associações estão descritas na tabela 6. As associações entre fatores de colonização e toxinas estão descritas nas Tabelas 7 e 8.

Quarenta e duas amostras não apresentaram FC nem *eae*, sendo que destas, onze também não apresentaram produção de toxina.

Onze amostras foram negativas para todos os fatores de virulência pesquisados neste trabalho, sendo cinco delas isoladas de bezerros com diarreia e seis delas isoladas de bezerros sadios. As associações dos fatores de virulência, bem como dos sorogrupos e sorotipos podem ser visualizados nas tabelas que se seguem.

Tabela 1. Número de amostras totais e fatores de colonização em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Número total de animais | No. de bezerros com diarreia e sem diarreia | No. de amostras isoladas de bezerros com e sem diarreia | Análise de Proporção (Z)* |
|-------------------------|---|---|---------------------------|
| 50 | 29 D _(a) | 58 D | Z= 0,14** |
| | 21 S _(b) | 43 S | |

| Fatores de colonização* | No. total de amostras (%) | Bezerros com e sem diarreia | Análise de Proporção (Z)** |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| CS31A | 20 (19,8%) | 18 D | Z= 3,5 |
| | | 02 S | |
| F17 | 05 (4,9%) | 04 D | Z= 0,34 |
| | | 01 S | |
| CS31A/F17 | 06 (5,9%) | 06 D | Z= 2,39 |
| <i>eae</i> | 43 (42,5%) | 35 D | Z= 4,24 |
| | | 8 S | |

(a) = diarreia

(b) = sadio

*Não foi encontrado resultado positivo para os FC K99, F41 e EAF.

** Z= resultado da análise proporcionalis entre bezerros com diarreia e sadios.

$\alpha_{0,05/2} = 1,96$, portanto, se $Z \geq 1,96$ = rejeitar hipótese nula (H_0), resultado proporcionalmente significante

$Z \leq 1,96$ = aceitar H_0 , resultado proporcionalmente insignificante.

Tabela 2. Toxinas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Toxinas* | No. total de amostras (%) | Bezerros com e sem diarreia | Análise de Proporção (Z)** |
|----------|---------------------------|--|----------------------------|
| VT1 | 43 (42,6%) | 24 D _(a) 19 S _(b) | Z= 0,3 |
| VT2 | 10 (9,9%) | 04 D 06 S | Z= 1,42 |
| Ehly | 08 (7,9%) | 04 D 04 S | Z= 0,62 |
| EAST1 | 40 (39,6%) | 17 D 23 S | Z= 2,6*** |
| CDT | 06 (5,9%) | 04 D 02 S | Z= 0,16 |
| CNF2 | 04 (3,9%) | 03 D 01 S | Z= 1 |
| LT-II | 02 (1,9%) | 02 D | Z= 1,5 |

(a) = diarreia

(b) = sadio

*Não foram encontrados resultados positivos para as toxinas STa, CNF1 e Hly.

**Z= resultado da análise proporcionais entre bezerros com diarreia e sadios.

*** $\alpha_{0,05/2} = 1,96$, portanto, se $Z \geq 1,96 =$ rejeitar hipótese nula (H_0), resultado proporcionalmente significativo

$Z \leq 1,96 =$ aceitar H_0 , resultado proporcionalmente insignificante.

Tabela 3. Sorogrupos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Sorogrupo | No. Amostras |
|--|--------------|
| O7 | 7 |
| O23 | 5 |
| O4, O8, O153, O156 | 4 |
| O103, O123, O146 | 3 |
| O1, O3, O15, O26, O49, O55, O128, O144, O148, O175 | 2 |
| O5, O6, O9, O10, O17, O76, O78, O85, O91, O113, O117, O119, O124, O126, O138, O169 | 1 |
| NT* | 21 |
| Rugosas | 7 |
| Total de amostras | 101 |

* NT: Não Tipável.

Tabela 4. Distribuição de sorogrupos de amostras de *Escherichia coli* com e sem diarreia.

| Sorogrupo | Bezerros com diarreia | Bezerros sadios | Sorogrupo | Bezerros com diarreia | Bezerros sadios |
|-----------|-----------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|-----------------|
| O1 | 2 | | O103 | 3 | |
| O3 | 1 | | O113 | | 1 |
| O4 | | 4 | O117 | 1 | |
| O5 | | 1 | O119 | | 1 |
| O6 | 1 | | O123 | 2 | 1 |
| O7 | 3 | 4 | O124 | 1 | |
| O8 | 4 | | O126 | 1 | |
| O9 | 1 | | O128 | | 2 |
| O10 | 1 | | O138 | | 1 |
| O15 | | 2 | O144 | 1 | 1 |
| O17 | 1 | | O146 | 3 | |
| O23 | 4 | 1 | O148 | | 2 |
| O26 | 2 | | O153 | 3 | 1 |
| O49 | 1 | 1 | O156 | | 4 |
| O55 | 2 | | O169 | | 1 |
| O76 | 1 | | O175 | | 2 |
| O78 | 1 | | NT* | 11 | 10 |
| O85 | | 1 | Rugosa | 5 | 2 |
| O91 | 1 | | Total de amostras | 58 | 43 |

* NT: Não Tipável.

Tabela 5. Associação dos fatores de colonização e toxinas em amostras de *Escherichia coli eae+* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Fatores de Colonização | Toxinas | No. de amostras |
|-------------------------------|----------------|------------------------|
| CS31A+ | VT1+ | 2* |
| | EAST1+ | 1 |
| | VT2+ | 1 |
| | VT1+/EAST1+ | 2 |
| | VT1+/Ehly+ | 1 |
| | Sem toxina | 1 |
| F17+ | VT2+ | 1 |
| | CDT+/CNF2+ | 1 |
| | EAST1/CNF2+ | 1 |
| | Sem toxina | 1 |
| CS31A+/F17+ | VT1+ | 1 |
| | VT1+/EAST1+ | 1 |
| | Sem toxina | 1 |
| Sem FC pesquisados | VT1+ | 5 |
| | EAST1+ | 3 |
| | CDT+ | 2 (1D/1S)** |
| | Ehly+ | 2 (1D/1S) |
| | VT1+/CDT+ | 1 |
| | VT1+/EAST1+ | 4 (1D/3S) |
| | VT1+/Ehly+ | 3 (1D/2S) |
| | CNF2+ | 1 |
| | EAST1+/Ehly+ | 1 |
| | Sem toxina | 6 (5D/1S) |

*Todas as amostras foram isoladas de bezerros com diarreia

** D: diarreia / S: sem diarreia

Tabela 6. Associação dos fatores de colonização e toxinas em amostras de *Escherichia coli eae*-isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Fatores de Colonização | Toxinas | No. de Amostras |
|-------------------------------|-------------------|------------------------|
| CS31A+ | VT1+ | 1* |
| | EAST1+ | 2(1D/1S)** |
| | VT1+/CDT+ | 1 |
| | VT1+/VT2+/EAST1+ | 1 |
| | VT1+/EAST1+ | 2 (1D/1S) |
| | Sem toxina | 5 |
| F17+ | EAST1+ | 1 (S) |
| CS31A+/F17+ | VT1+ | 1 |
| | Sem toxina | 2 |
| Sem FC pesquisados | VT1+ | 4(1D/3S)** |
| | VT2+ | 3 (S) |
| | EAST1+ | 9 (S) |
| | VT1+/VT2+ | 1(S) |
| | VT2+/EAST1+ | 1(S) |
| | VT1+/VT2+/EAST1+ | 1 |
| | VT1+/VT2+/Ehly+ | 1(S) |
| | VT1+/EAST1+ | 8(1D/7S) |
| | EAST1/LT-II | 1 |
| | VT1+/EAST1+/LT-II | 1 |
| | VT1+/CDT+/CNF2+ | 1 (S) |
| | Sem toxina | 11(5D/6S)** |

* Todas as amostras foram isoladas de bezerros com diarreia

** D: diarreia / S: sem diarreia

Tabela 7. Associação de sorogrupos com fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* *eae+* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Sorotipo/Sorogrupo | Bezerros com diarreia/ Sadios | FC** | Toxinas |
|--------------------|----------------------------------|-----------|------------|
| O1 | D* | - | - |
| O3 | D | - | EAST1 |
| O4 | S | - | VT1/EAST1 |
| O7 | D | - | EAST1 |
| O8 | D | F17 | VT2 |
| | D | CS31A | VT2 |
| | D | - | - |
| | D | - | CDT |
| O17 | D | F17 | CNF2/EAST1 |
| O23 | D | CS31A | VT1/EAST1 |
| | D | CS31A | EAST1 |
| | D | - | - |
| | D | F17 | - |
| O26 | D | CS31A | VT1 |
| | D | - | Ehly |
| O55 | D | - | VT1/CDT |
| | D | - | VT1 |
| O78 | D | F17 | CNF2/CDT |
| O103 | D | - | VT1 |
| O117 | D | CS31A | VT1/EAST1 |
| O123 | D | - | VT1/Ehly |
| | S* (2 amostras) | - | VT1/EAST1 |
| O124 | D | - | VT1 |
| O144 | D | CS31A/F17 | VT1 |
| | D | CS31A/F17 | - |
| O146 | D | CS31A/F17 | VT1/EAST1 |
| | D | - | VT1/EAST1 |
| | D | - | - |
| O153 | D | - | - |
| | D | - | CNF2 |
| O156 | S | - | Ehly |
| | S (2 amostras) | - | VT1/Ehly |
| | S | - | - |
| O175 | S | - | CDT |
| Não-Tipável (NT) | D | CS31A | VT1/Ehly |
| | D | - | EAST1 |
| | D (2 amostras) | - | VT1 |
| | D | CS31A | - |
| Rugosa | D | - | EAST1/Ehly |
| | D | CS31A | VT1 |

Total de amostras: 43

*D: diarreia/S: sadio

**FC: Fator de Colonização

Tabela 8. Associação de sorogrupos com fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* eae- isoladas de bezerros com e sem diarreia.

| Sorotipo/Sorogrupo | Bezerros com diarreia/ Sadios | FC** | Toxinas |
|--------------------|-------------------------------|-----------|-----------------|
| O1 | D* | CS31A | VT1 |
| O3 | D | CS31A | - |
| O4 | S (3 amostras)* | - | EAST1 |
| O5 | S | - | EAST1 |
| O6 | D | CS31A | EAST1 |
| O7 | D | CS31A | VT1/VT2/EAST1 |
| | S (3 amostras) | - | VT1/EAST1 |
| | S | CS31A | VT1/EAST1 |
| O10 | D | CS31A | VT1/CDT |
| O15 | S (2 amostras) | - | VT1/EAST1 |
| O23 | S | - | VT2 |
| O49 | D | CS31A | - |
| | S | - | EAST1 |
| O85 | S | CS31A | EAST1 |
| O103 | D | - | VT1 |
| | D | - | VT1/EAST1 |
| O113 | S | - | VT1/VT2/Ehly |
| O119 | S | - | VT2/EAST1 |
| O126 | D | CS31A/F17 | - |
| O128 | S | - | VT1/EAST1 |
| O138 | S | - | EAST1 |
| O148 | S | F17 | EAST1 |
| O153 | D | - | VT1/EAST1/VT2 |
| | S | - | VT1/EAST1 |
| O169 | S | - | EAST1 |
| O175 | S | - | VT1/CDT/CNF2 |
| Não-Tipável (NT) | D | CS31A/F17 | - |
| | D | CS31A/F17 | VT1 |
| | D (3 amostras) | CS31A | - |
| | S (2 amostras) | - | EAST1 |
| | S (3 amostras) | - | VT1 |
| Rugosa | S | - | VT2 |
| | D | - | LT-II/EAST1 |
| | D | - | VT1/LT-II/EAST1 |
| | S | - | VT1/VT2 |
| | S | - | VT2 |
| | D | CS31A | VT1/EAST1 |

Total de amostras: 47

*D: diarreia/S: sadio

Obs.: Onze amostras foram negativas para todos os fatores de virulência pesquisados.

5. Discussão

A colibacilose bovina é um dos maiores problemas da pecuária mundial. Infecções intestinais podem acometer bezerros de uma a oito semanas de idade, sendo causadas quase sempre por *Escherichia coli* patogênicas. Bezerros saudáveis eventualmente albergam subtipos com tal potencial, mas não necessariamente causando doenças. Levando em consideração estes fatos é possível, portanto, reconhecer tais animais como reservatórios de amostras com poder de causar infecção em humanos (Urdahl *et al.*, 2003).

Uma vez que a colibacilose bovina vem sendo considerada uma das principais causas de perdas econômicas da pecuária mundial, e levando em consideração que o estudo da epidemiologia desta doença no Brasil ainda não está totalmente fechado e bem descrito, faz-se necessário verificar quais os fatores de virulência importantes no desenvolvimento da diarreia bovina e identificar os sorogrupos prevalentes. Estes estudos dão suporte para melhor compreensão da colibacilose que acomete bovinos no Brasil, principalmente bezerros, podendo até surgir novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas.

A infecção por *E. coli* está muito relacionada a fatores ligados à integridade física do animal e seu manejo. Entre os fatores mais considerados então: a idade do animal, a vitalidade do bezerro ao nascer e a sua imunidade. A sensibilidade do bezerro aos agentes infecciosos está diretamente ligada à idade do animal. É considerado como o período de maior risco dos bezerros adquirirem infecções entre as três primeiras semanas de vida e dentro deste período, a maior incidência de casos de diarreia está na segunda semana de vida (Garcia *et al.*, 1999).

Para a realização deste estudo utilizaram-se métodos moleculares e alguns métodos fenotípicos para traçar o perfil de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia. Uma vez que a técnica de PCR se mostra como um método bastante específico e rápido

na literatura, os testes moleculares foram realizados para caracterizar as amostras de *Escherichia coli* quanto a presença de genes de fatores de colonização e toxinas mais relevantes na colibacilose bovina, indicados na literatura nacional e internacional. Foram realizados também ensaios para a detecção da produção de Verotoxina e determinação dos sorogrupos prevalentes, tentando assim, traçar um perfil completo das amostras.

Ao comparar a incidência de fatores de colonização em amostras de *E. coli* a literatura mostra uma variedade de resultados. Contrepolis *et al.* (1989) estudando amostras bovinas isoladas na França, Canadá e Índia observaram que 41,7% apresentaram CS31A. No Brasil, Valadares *et al.* (1999), estudando amostras de *E.coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Campo Grande, MS, relataram que entre 255 amostras, 47 (18,4%) foram positivas para CS31A e, dentre estas, 13 apresentaram associação com F17. Bertin *et al.* (2000) estudando 118 amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia e/ou septicemia na França observaram a presença da associação de CS31A/F17 em 34% das amostras, de F17 em 27,1% e CS31A em 17,8% das amostras. Mais recentemente, Mercado *et al.* (2003) encontraram o FC CS31A em 21% dos isolados obtidos de bezerros na Argentina e entre estas, 14,3% apresentaram F17 associados. Nesse estudo, das 58 amostras de *E. coli* de origem diarreica, 24 (41,3%) foram positivas para CS31A, dez amostras (17,2%) foram F17+ e dentre estas se observou a associação de CS31A com F17 em seis amostras (10,3%). Por outro lado, das 43 amostras isoladas de animais sadios, apenas três *E. coli* (7,0%) apresentaram FC, sendo duas amostras CS31A e uma F17. Pode-se então observar uma grande diferença no que diz respeito aos fatores de colonização detectados na França e os detectados na América do Sul, mostrando a diversidade da prevalência desses fatores nas diferentes regiões. Vale ressaltar que 90% das amostras CS31A+ foram isoladas de quadro diarreico e analisando as proporções dos resultados obtidos ($Z= 3,5$, ou seja, proporcionalmente significativa) e ainda, que todas as amostras CS31A+/F17+ foram isoladas de

bezerros com diarreia ($Z=2,39$, proporcionalmente significativo), isso mostra que tais fatores de virulência estariam envolvidos no quadro diarreico desses bezerros, visto que tais FC estão relacionados com quadro diarreico e septicêmico. Em compensação, das cinco amostras F17+ sem associação com CS31A, quatro foram isoladas de bezerros com diarreia, mas este resultado não mostrou significância para o quadro diarreico ($Z=0,34$, menor que $Z=1,96$).

Wieler *et al.* (1996) estudando 174 amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia na Alemanha verificaram que 122 (70,1%) apresentaram o gene *eae*. Osek & Winiarczyk (2001) estudando amostras de bezerros saudáveis na Europa observaram que o gene *eae* foi detectado em 84 (21,5%) de um total de 390 amostras estudadas. Mais recentemente, Salvadori *et al.* (2003), trabalhando com 205 amostras isoladas de bezerros com diarreia do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, verificaram que apenas 3,4% das amostras apresentavam o gene *eae*. Nesse mesmo ano, Leomil *et al.* (2003) observaram que dentre as 24 VTEC isoladas de bezerros, 10 apresentaram o gene *eae*, sendo sete isoladas de animais com diarreia e 3 de animais sadios. Ugrinovich (2004) estudando *E. coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia no Estado de São Paulo, mostrou que dentre as 98 amostras isoladas 48 (49%) apresentaram o gene *eae*. Porém, quando comparada à prevalência deste gene entre as amostras isoladas de bezerros com diarreia e sadios, foi observado que 50% eram de origem diarreica e 50% de amostras controle. No recente artigo publicado por Irino *et al.* (2005), estudando amostras VTEC isoladas de gado leiteiro adulto, detectaram a presença do gene *eae* em 1% das amostras de *Escherichia coli*.

Foram encontrados 43 amostras de *E. coli* (42,6%) com resultado positivo para o gene *eae*, sendo 35 amostras (34,6%) de origem diarreica e oito (7,9%) isoladas de bezerros sadios. Ou seja, das amostras de *E. coli eae* positivas encontradas, 81,3% foram isoladas de bezerros com diarreia e 34,4% das amostras de *E. coli* diarreicas só apresentaram o gene *eae* como fator de colonização. Concordando com Leomil *et al.* (2003) e diferente do observado por

Ugrinovich (2004), esses resultados indicam que o gene *eae* está associado ao quadro diarréico de bezerros, visto que a análise proporcional das amostras reforça esta afirmação ($Z=4,24$, maior que $Z=1,96$).

Vale ressaltar que foram observadas diferenças relevantes quanto à presença ou não do gene *eae* entre as amostras isoladas em localidades de diferentes estados do nosso país, e, mesmo entre as amostras isoladas na Europa. Deste modo, os resultados obtidos suscitam que novos e mais amplos estudos sejam realizados visando determinar a prevalência do gene *eae* no rebanho brasileiro, considerando a extensão do país, manejo, raças, tamanho do rebanho e sua finalidade (corte ou leite).

Menge *et al.* (1999) mostraram em seu estudo que VT1 tem contribuído para a patogênese de VTEC associada à diarréia em bezerros, suprimindo a resposta imune associada à mucosa do organismo hospedeiro. Urdahl *et al.* (2003), estudando amostras de *E. coli* isoladas de bezerros sadios em fazendas de gado leiteiro na Alemanha, encontraram 64,6% das amostras positivas para VT e, dessas, a grande maioria foi VT1. Moreira *et al.* (2003) utilizando ensaios com células Vero para verificação da produção de VT, mostraram que 49% dos bezerros estudados de fazendas de gado leiteiro no sul do Brasil apresentaram VTEC em sua flora intestinal. Leomil *et al.* (2003) relataram entre as amostras VTEC isoladas de bezerros que 50% eram VT1, 33,3% VT1/VT2 e 16,7% VT2. Um estudo recente feito por Mercado *et al.* (2004) na Argentina, mostrou que 80% das VTEC isoladas de bezerros com diarréia apresentaram gene para VT1. Ugrinovich (2004) observou que dentre as 98 amostras estudadas, 76 foram positivas para o gene *stx*, sendo VT1 a mais freqüente (59,2%). Um recente estudo realizado por Irino *et al.* (2005) relata que 97% das VTEC isoladas de gado leiteiro adulto apresentaram VT2 ou VT1/VT2. Um outro estudo desenvolvido por Zweifel *et al.* (2005) com amostras de *E. coli*

isoladas de gado de corte na Suécia detectaram 43% VT1+, 20% VT2+ e 9% VT1/VT2+. Neste trabalho ainda foram observados os genes *eae* em 21% das amostras.

Os resultados obtidos no presente estudo se mostram muito semelhante aos trabalhos anteriores quando evidencia que a toxina mais freqüente foi a Verotoxina, detectada em 52,5% das amostras. Por outro lado, observamos a VT1 como a de maior prevalência (81,1%). Dados esses que confirmam que VTEC produtora de VT1 está muito mais associada a bezerros que VTEC produtora de VT2 (Wieler *et al.*, 1996; Orden *et al.*, 2002) e são contrários ao citado por Irino *et al.* (2005). Além disto, este trabalho mostra que bezerros podem sim, ser reservatórios de VTEC, pois entre as 43 *E. coli* VT1+, 24 foram isoladas de bezerros com diarreia e 19 amostras isoladas de bezerros saudáveis, mas proporcionalmente não existe significância com o quadro diarreico ($Z=0,3$, menor que $Z=1,96$).

Neste trabalho, entre as amostras de *E. coli* VT1+ isoladas de bezerros com diarreia, 62,5% apresentaram associação com o gene *eae*. Entre as 19 amostras VT1+ isoladas de bezerros sem diarreia, 26,3% estavam associadas ao *eae*. Blanco *et al.* (1997a), estudando bezerros saudáveis de fazendas leiteiras e de corte em Lugo, Espanha, encontraram 27% das amostras positivas para VT1, mas apenas 0,8% de amostras *eae* positivas. Cobbold & Desmarchelier (2001) estudando amostras isoladas de bovinos saudáveis de diferentes idades na Austrália, observaram que 29% das amostras VTEC isoladas apresentavam o gene *eae*. Na Espanha, Orden *et al.* (2002) encontraram 24,3% de VTEC isoladas de bezerros saudáveis portadoras do gene *eae*, sendo muitas delas associadas a VT1.

Boerlin *et al.* (1999) mostraram em seu estudo uma associação significativa entre a presença do gene *eae* e VT2 em amostras de origem humana. Esta associação raramente é encontrada em amostras isoladas de bovinos. Nesse trabalho foram detectadas 9,9% das amostras

de *E. coli* VT2+ e destas, 20% estavam associadas ao gene *eae*. 80% das amostras VT2+ (oito amostras) não apresentaram o gene *eae* e seis amostras foram isoladas de bezerros saudáveis.

Irino *et al.* (2003), estudando amostras de *E. coli* isoladas de bezerros do estado de São Paulo, observaram que 94% das VTEC encontradas eram produtoras de VT2 e apenas 6% eram produtoras de VT1, fato que não se assemelha aos resultados aqui detectados. Um recente estudo realizado por Irino *et al.* (2005) relata que só foi possível verificar a presença do gene *eae* em 1% de amostras VTEC, restritos aos sorotipos O157:H7 e O111:HNM, sorotipos esses característicos de EHEC. Esses estudos ratificam nossa afirmação anterior quando em se tratando da grande variedade de sorogrupos e sorotipos VTEC existentes no rebanho bovino brasileiro e mundial.

A identificação de amostras VTEC capazes de produzir verotoxina pode ser realizada em ensaios celulares. A expressão de VT foi confirmada em ensaios de citotoxicidade em todas as amostras VT positivas em testes de PCR. O mesmo foi observado com amostras Ehly positivas em ensaios de PCR quando testadas em Ágar Sangue. Diferentemente do nosso trabalho, Irino *et al.* (2005), relatam que 88% das amostras apresentaram o gene de Ehly, mas apenas uma amostra mostrou atividade em Ágar Sangue.

Ehly está fortemente associada a *E. coli* produtoras de Verotoxina (VTEC) isoladas de bezerros (Beutin, *et al.*, 1993; Holland *et al.*, 1999; Cobbold & Desmarchelier, 2001). No Brasil, Irino *et al.* (2003) observaram que 80% das amostras VTEC eram produtoras de Ehly. A baixa frequência de Ehly observada entre as amostras estudadas no presente trabalho, apenas oito amostras (7,9%) e ainda mostrando pouca significância no quadro diarréico ($Z=0,62$, menor que $Z=1,96$) o que não era esperado, pois no Brasil Irino *et al.* (2003) e Ugrinovich (2004) encontraram muitas amostras produtoras de Ehly.

Os resultados encontrados nos estudos realizados no rebanho bovino brasileiro no que tange a prevalência de variedades de VT (VT1 e/ou VT2) e da sua associação com o gene *eae* mostram-se controversos. Do mesmo modo, também controversos os estudos que dizem respeito a VTEC isoladas de bezerros em diferentes continentes.

Segundo Osek *et al.* (2000) não foi encontrada nenhuma associação entre VT e F17, mas 46,7% das amostras estudadas pelos autores apresentaram resultado positivo para Ehly. Além disso, estudo que difere totalmente do nosso trabalho e se assemelha aos demais vistos anteriormente, mostrando que no Brasil o risco de contaminação humana por estes patógenos é grande, representando um fator de risco a saúde humana.

Neste aspecto, o presente trabalho mostra-se compatível com a literatura publicada até o momento, pois bezerros podem apresentar VTEC como parte de sua microbiota intestinal e esta nem sempre está associada ao gene *eae* e, o fato desse microrganismo estar presente em seu trato gastrointestinal, não necessariamente estaria associado a quadros de diarreia. É importante salientar também a diversidade de amostras isoladas em diferentes estados brasileiros, que por tratar-se de um país de grande área geográfica e com muitos rebanhos bovinos, a diversidade dos fatores de virulência de VTEC pode ser um fato previsível.

Trinta e cinco amostras de *E. coli* (34,6%) foram positivas para a toxina EAST1, sendo grande parte associadas a VT1 e ao fator de colonização CS31A. Até o momento este é o primeiro relato de associação entre amostras CS31A/VT1. Não foi observada nenhuma publicação a associação entre CS31A e VT1 em bovinos com e sem diarreia em outros países e até mesmo em outros estados brasileiros.

Bertin *et al.* (1998) encontraram a associação entre CS31A e EAST1 em 87% das amostras de *E. coli* CNF1 positivas estudadas e em 72% das amostras negativas para CNF1. Um estudo realizado por Valadares (2000), com amostras de *E. coli* do Mato Grosso do Sul, Brasil,

revelou que entre as amostras CS31A positivas 29,8% estavam associadas a EAST1, 8,5% do total das amostras apresentaram VT1 e nenhuma amostra apresentou VT2. Ugrinovich (2004) encontrou apenas duas amostras de *E. coli* (2%) EAST1 positivas, sendo uma em amostra de origem diarréica e outra em bezerro sadio, em bezerros do Estado de São Paulo. Irino *et al.* (2005) encontraram em seu trabalho apenas 4,9% das amostras portadoras do gene para EAST1, sendo que todas elas estavam associadas a VT1 e VT2. Este estudo indicou ainda que EAST1 não estava envolvido com o quadro diarréico, pois quando analisadas as proporções entre as *E. coli* EAST1+ isoladas de bezerros com e sem diarréia, o resultado mostrou-se proporcionalmente significativo ao constatar que EAST1 foi mais prevalente entre os isolados de bezerros sadios aos isolados de bezerros com diarréia ($Z=2,6$, maior que $Z=1,96$).

Quanto às demais toxinas detectadas entre as amostras pesquisadas neste trabalho, o número de amostras positivas pode ser questionável e também pouco significativo ($Z < 1,96$, aceitando hipótese nula). A associação entre amostras NTEC com quadros diarréicos é questionada, mas Orden *et al.* (1999) encontraram a maioria das amostras isoladas NTEC associadas a quadros diarréicos. Orden *et al.* (2002), estudando amostras de *E. coli* isoladas de bezerros de diferentes idades na Espanha, encontraram 10,9% de amostras positivas para CNF e todas elas produtoras de CNF2.

Van Bost *et al.* (2001), estudando 430 amostras isoladas de bezerros com diarréia na Bélgica, encontraram 8% de amostras produtoras de CNF. Nestas, verificou-se que 57% apresentavam associação entre a produção de CNF2 e toxina CDTIII. Neste trabalho, foi encontrado 3,9% das amostras produtoras de CNF2 e destas 50% (duas amostras) associadas a CDT. Proporcionalmente, tal resultado não mostrou significância para o quadro diarréico das amostras estudadas neste trabalho ($Z=1$, menor que $Z= 1,96$).

Um trabalho desenvolvido recentemente por Pickett *et al.* (2004) mostrou a associação, em amostras de *E. coli* de origem humanas, de CDTIII com outros fatores de virulência ligados a VTEC e NTEC. As amostras produtoras de CDT apresentaram-se positivas também para VT1 e CNF2. Neste trabalho 66,6% das amostras CDTIII positivas apresentaram associação com o gene *eae*. De fato, esses resultados estão condizentes com os resultados de Orden *et al.* (1999) e Van Bost *et al.* (2001), sendo mais um indicativo da necessidade de maiores estudos com as amostras *E. coli* isoladas de bezerros no Brasil.

Em 2002, Ugrinovich *et al.* relataram o isolamento de uma amostra de *E. coli* LT-II+ a partir de fezes de bezerro com diarreia. Em um trabalho mais recente, Salvadori *et al.* (2003) encontraram em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia 8,3% das amostras positivas para LT-II. No presente trabalho verificamos a presença do gene de LT-II em apenas 1,9% das amostras isoladas de bezerros com diarreia. A baixa frequência observada por diferentes autores e neste trabalho, sugere que a LT-II não deva ter um papel importante na colibacilose bovina.

Não foi encontrada nas amostras de *E. coli* estudadas reação positiva para o plasmídeo EAF. Esse trabalho está confirmando a literatura, pois já é conhecido que amostras VTEC e EHEC não apresentam tal plasmídeo (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Szalo *et al.*, 2002). Amostras EHEC apresentam plasmídeo muito similar ao EAF, mas neste não está inserido o gene responsável pela expressão de BFP (Szalo *et al.*, 2002). A associação de CNF1 e Hly tem sido frequentemente relatada em amostras isoladas de infecções extraintestinais (I.T.U. e septicemia) de humanos (Blanco & Blanco, 1993; Orden *et al.*, 1999). Concordando com a literatura, os genes para as toxinas Hly e CNF1 não foram detectados nas amostras por nós estudadas.

Vale a pena ressaltar a ausência do gene para STa nas amostras analisadas, indicando não se tratar de amostras enterotoxigênicas (ETEC) pois, assim como K99 e F41, que não foram encontrados nas amostras estudadas, estes fatores de virulência são característicos deste grupo de *E. coli* diarreogênicas (Blanco & Blanco, 1993). Frank *et al.* (1998) estudando amostras de bezerros para validação de reações de PCR multiplex não encontrou associação alguma entre os fatores de virulência ligados a ETEC e VTEC. Apenas 4% das amostras apresentaram um perfil VT2/STa, o que é um fato incomum. Mais tarde, Osek *et al.* (2000) não encontraram genes para K99, F41, STa, STb, LT-I e LT-II em amostras VTEC. Estes trabalhos confirmam nosso estudo, mostrando que fatores de virulência ligados a ETEC não são encontrados em amostras VTEC.

Nesse estudo foram identificados 35 sorogrupos. Todos os sorogrupos estão associados a VTEC em bovinos (<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTYPESBOV.htm/SEROTYPESHUM.htm/> 28/10/2004; Vaz *et al.*, 2004). Em relação às amostras *eae+*/VT1+, oito sorogrupos estão associados a VTEC em bovinos: O4, O8, O23, O26, O55, O103 e O146, O156. Das amostras VT1+, onze sorogrupos encontrados estão associados a VTEC em bovinos: O1, O7, O10, O15, O23, O103, O113, O119, O128, O153 e O175. Ainda dentro do grupo de amostras VTEC (*eae+*/VT1+), nove amostras estão associadas a isolados capazes de causar doença em humanos, sendo eles: O4, O8, O23, O55, O117, O123, O124, O144 e O146. Apenas dois sorogrupos estão associados fortemente a doença em humanos (O26 e O156). Nas amostras VTEC portadoras de VT1, dez sorogrupos estão associadas a VTEC humana, como O1, O7, O15, O23, O103, O113, O119, O128, O153 e O175, mas apenas os sorogrupos O103 e O113 estão associados com diarreia grave em humanos (<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTYPESBOV.htm/SEROTYPESHUM.htm/> 28/10/2004). Apesar de não ser verificado nesse trabalho o sorogrupo O157, os sorogrupos O26 e O156 estão fortemente associados a doenças tanto em bovinos como em humanos e alguns sorogrupos como O55, O91, O103, O111,

O113 estão sendo considerados atualmente por vários pesquisadores como patógenos emergentes, causadores de diarreias em humanos e diarreia grave em bezerros em diferentes países, inclusive o Brasil (Vaz *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2000).

Estes resultados demonstram a importância de estudos mais aprofundados sobre colibacilose em bovinos no Brasil, nas suas diferentes regiões geográficas, e para animais submetidos os diferentes manejos e para diferentes finalidades, como gados de corte ou leiteiro, por se tratar de um possível risco à Saúde Pública.

De acordo com os resultados obtidos, foi confirmado que bezerros são reservatórios de amostras não O157 produtoras de VT do tipo 1, uma vez que sorogrupos de grande relevância foram encontrados, O55, O91, O103, O111, além de sorogrupos já descritos como causadores de doenças em humanos como O26, O103, O113, O153 e O156, o que pode ser considerado um risco para saúde pública.

O papel do gene *eae* na colibacilose bovina deve ser melhor estudado e a confirmação da associação entre o fator de colonização CS31A com a toxina VT1 em amostras isoladas do rebanho brasileiro se faz necessária, por se tratar de um país de dimensões geográficas consideráveis e a diversidade biológica quando se trata de fatores de virulência ligados a colibacilose bovina.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho chega-se as seguintes conclusões:

- a) O gene *eae* foi encontrado em uma grande porcentagem em *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia e também associado à toxina VT1;
- b) A toxina VT1 foi detectada com maior frequência nas amostras (42,5%) em comparação a VT2, confirmando os dados da literatura sobre a prevalência de VTEC1, sendo que todas as amostras positivas mostraram atividade em células Vero;
- c) A pouca diferença entre as amostras VT1+ isoladas de bovinos com e sem diarreia, afirma que bezerros são reservatórios de VTEC, indicando grande risco a saúde pública;
- d) A associação de CS31A com VT1 (42,3% das amostras CS31A+) ainda não havia sido descrita até o presente momento, mostrando uma nova associação entre fatores de colonização e toxinas em amostras isoladas no Brasil;
- e) Os sorogrupos identificados nas amostras estão relacionados a sorogrupos de VTEC de bovinos, sendo os sorogrupos O26, O103, O113 e O156 associados a doença em humanos;
- f) Cinquenta por cento das amostras CNF2 positivas apresentaram associação com CDTIII;

- g) A presença de LT-II nas amostras estudadas embora em uma porcentagem não significativa sugere maiores estudos relacionados à colibacilose bovina;
- h) Pode-se considerar que bezerros são reservatórios de amostras não O157 produtoras de VT do tipo 1, uma vez que sorogrupos de grande relevância foram encontrados, alguns deles ainda podendo ser causadores de doenças em humanos;
- i) Não foram identificados os fatores de virulência F41, K99, STa, mostrando não se tratar de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e também não foi observado resultado positivo para CNF1 e Hly e EAF;
- j) Este trabalho reforça a necessidade de maiores estudos sobre a colibacilose no Brasil, uma vez que os dados do trabalho são confrontantes com o da literatura e mostra ainda uma grande diferença entre os fatores de virulência encontrados em amostras de diferentes regiões do nosso país.

7. Referências Bibliográficas

- AGBODAZE, D. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, 22: 221-230, 1999.
- ALBERT, M.J., FARUQUE, S.M., FARUQUE, A.S.G., BETTELHEIM, K. A., NEOGI, P.K.B., BHUIYAN, N.A., KAPER, J. Controlled study of cytotoxic distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladesh children. **J. Clin. Microbiol.** 34: 717-719, 1996.
- BERTIN, Y., MARTIN, C., OSWALD, E., GIRARDEAU, J. P. Rapid and specific detection of F17 related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2921-2928, 1996.
- BERTIN, Y., MARTIN, C., GIRARDEAU, J.P., POHL, P., CONTREPOIS, M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF-1 producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. **FEMS Microbiol. Lett.** 162: 235-239, 1998.
- BERTIN, Y., GIRARDEAU, J.P., DARFEUILLE-MICHAUD, A., MARTIN, C. Epidemiological study of *pap* genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of *pap*_{31A} fimbriae. **J. Clin. Microbiol.** 38: 1502-1509, 2000.

BEUTIN, L., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., ØRSKOV, I., ØRSKOV, F.

Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Zentralbl. Bakteriол. Hy.** 267: 576-588, 1988.

BEUTIN, L. STEINRUCK, H., ZIMMERMAN, S., SCHEUTZ, F. Prevalence and some

properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J. Clin. Microbiol.** 31: 2483-2488, 1993.

BIELASZEWSKA, M., FELL, M., GREUNE, L., PRAGER, R., FRUTH, A., TSCHAPE, H.,

SCHMIDT, M.A., KARCH, H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. **Infect Immun.** 72: 1812-1816, 2004.

BLANCO, J., BLANCO, M., ALONSO, M.P., BLANCO, J.E., GARABAL, J.I., GONZÁLES,

E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiol. Lett.**, 96: 155-160, 1992.

BLANCO, J., BLANCO, M. *Escherichia coli* Enterotoxigenicos, Necrotoxigenicos y

Verotoxigenicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. **Serv. Publ. Provincial**, Lugo Espanha, 1993.

BLANCO, M., BLANCO, J. E., BLANCO, J., GONZALÉZ, E. A., ALONSO, M. P., MAAS,

H., JANSEN, W. H. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic

Escherichia coli strains isolated in Galicia (north-western Spain). **Eur. J. Epidemiol.** 12: 13-19, 1996.

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

BLANCO, M., BLANCO, J.E., GONZÁLEZ, E.A., MORA, A., JANSEN, W., GOMES, T.A.T., ZERBINI, L.F., YANO, T., PESTANA DE CASTRO, A.F., BLANCO, J. Genes encoding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2958-2963, 1997.

BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., ALONSO, M.P., GONZÁLEZ, E.A., BERNÁRDEZ, M.I. Epidemiology of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: Duffy, G., Garvey, P., McDowell, D.A. (Eds.), Verotoxigenic *E. coli*. **Food and Nutrition Press, Inc.**, Trumbull, CT, pp. 113-148, 2001.

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

- BUTLER, D.G., CLARKE, R.C. Diarrhoea and dysentery in calves. In: *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Ed. by C.L. Gyles. Ontario Vet. College, Univ. Guelph, Canada, p.91-116, 1994.
- CERQUEIRA, A.M., GUTH, B.E., JOAQUIM, R.M., ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Microbiol.**, 70: 111-121, 1999.
- CHINA, B., GOFFAUX, F., PIRSON, V., MAINIL, J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Lett.** 178: 177-182, 1999.
- CLARK, C.G., JOHNSON, S.T., EASY, R.H., CAMPBELL, J.L., RODGERS, F.G. PCR for detection of *cdtIII* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. **J. Clin. Microbiol.** 40: 2671-2674, 2002.
- CLARKE, S. T. Diarrheogenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 41: 93-98, 2001.
- COBBOLD, R. & DESMARCHELIER, P. Characterization and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. **Vet. Microbiol.** 79: 323-335, 2001.

- CONTREPOIS, M., FAIRBROTHER, J.M., KAURA, Y.K., GIRARDEAU, J.P. Prevalence of CS31A and F165 surface antigen in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. **FEMS Microbiol. Lett.** 59: 319-324, 1989.
- CONTREPOIS, M., BERTIN, Y., POHL, P., PICARD, B., GIRARDEAU, J.P. A study of relationships among F17 a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic calves. **Vet. Microbiol.** 64: 75-81, 1998.
- DE RYCKE, J., PLASSIART, G. Toxic effect for lambs of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. **Res. Vet. Sci.** 49: 349-354, 1990.
- DE RYCKE, J., MILON, A., OSWALD, E. Necrotizing *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Vet. Res.** 30: 221-234, 1999.
- DE RYCKE, J., OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation. **FEMS Microbiol. Lett.** 203: 141-148, 2001.
- FIDOCK, D. A., McNICHOLAS, P. A., LEHRBACH, P. R. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli* B41. **Nucl. Acids. Res.** 17: 2849-2849, 1989.
- FRANCK, S. M., BOSWORTH, B. T., MOON, H. W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. **J. Clin. Microbiol.** 36: 1795-1797, 1998.

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

GARCIA, A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., ORDEN, J.A., DE LA FUENTE, R. Diarrea neonatal del ternero: factores etiológicos. **Prod. Animal.** 147: 19-37, 1999.

GUINÉE P.A.M., AGTERBERG, C.M., JANSEN, W.H. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. **Appl. Microbiol.**, 24: 127-131, 1972.

GUNZBURG, S.T., TORNIEPORTH, N.G., RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR – bases detection of the bundle – forming pilus gene. **J. Clin. Microbiol.** 33: 1375-1377, 1995.

HESS, R.G., BACHMANN, P.A., BALJER, G., MAYR, A., POSPISCHII, A., SCHMID, G. Synergism in experimental mixed infections of newborn colostrums-deprived calves with bovine rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Zbl. Vet. Med. B.** 31: 585-596, 1984.

HOLLAND, R. E., WILSON, R. A ., HOLLAND, M. S., GURKAN, V. Y., MULLANEY, T. P., WHITE, D. G. Characterization of *eae+* *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. **Vet. Microbiol.** 66: 251-263, 1999.

<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTYPESBOV.htm> - 28/10/2004.

<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTYPESHUM.htm> - 28/10/2004.

IRINO, K., KATO, M.A.M.F., VAZ, T.M.I., SOUZA, M.A.C., CRUZ, A.S., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M., GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, São Paulo, Brazil. **In Res.:** 5th International Symposium of “Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections”. Edingurgh, Scotland, june 2003.

IRINO, K., KATO, M.A.M.F., VAZ, T.M.I., SOUZA, M.A.C., CRUZ, A.S., GOMES, T.A.T., VIEIRA, 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. **Vet. Microbiol.** 105: 29-36, 2005.

JANKA, A., BIELASZEWSKA, M., DOBRINDT, U., GREUNE, L., SCHMIDT, M.A., KARCH, H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. **Infect. Immun.** 71: 3634-3638, 2003.

JOHNSON, W. M., LIOR, H. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. **FEMS Microbiol. Lett.** 43: 19–23, 1987.

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

- KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J.I., STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 18: 775-779, 1977.
- LAW, D., Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. A Review. **J. Appl. Microbiol.** 88- 729-745, 2000.
- LAW, D., CHART, H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, 84: 685-697, 1998.
- LEOMIL, L., UGRINOVICH, A.L., GUTH, B.E.C., IRINO, K., VETTORATO, M.P., ONUMA, D.L., DE CASTRO, A.F.P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.** 97: 103 – 109, 2003.
- MAINIL, J.G., JACQUEMIN, E., POHL, P., FAIRBROTHER, J.M., ANSUINI, A., BOUGUÉNEC, C.L., BALL, H.J., DE RYCKE, J., OSWALD, E. Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farms animals and from humans. **Vet. Microbiol.** 70: 123-135, 1999.
- MAINIL, J.G., GÉRARDIN, J., JACQUEMIN, E. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. **Vet. Microbiol.**, 73: 327-335, 2000.

- MAINIL, J.G., JACQUEMIN, E., OSWALD, E. Prevalence and identity *cdt*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*. **Vet. Microbiol.** 94: 159 – 165, 2003.
- MENÁRD, L.P., LUSSIER, J.G., LÉPINE, F., SOUSA, C.P., DUBREUIL, D. Expression, purification and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. **Prot. Expr. Purif.** 33: 223-321, 2004.
- MENGE, C.L., WIELER, L.H., SCHALAPP, T., BALJER, G. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulation *in vitro*. **Infect. Immun.** 67: 2209-2217, 1999.
- MERCADO, E. C., RODRÍGUEZ, S. M., ANTUONO, A.L., CIPOLLA, A.L., ELIZONDO, A.M., ROSSETI, C. Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing *Escherichia coli* in calves with diarrhoea and septicaemia in Argentina. **J. Vet. Med. B.** 50: 8-13, 2003.
- MERCADO, E.C., GIOFFRÉ, A., RODRÍGUEZ, S.M., CATALDI, A., IRINO, K., ELIZONDO, A.M., CIPOLLA, A.L., ROMANO, M.I., MALENA, R., MÉNDEZ, M.A. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. **J. Vet. Med.** 51: 82-88, 2004.
- MOREIRA, C. N., PEREIRA, M. A., BROD, C. S., RODRIGUES, D. P., CARVALHAL, J. B., ALEIXO, J. A. G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in Southern Brazil. **Vet. Microbiol.** 93: 179-183, 2003.

- NAGY, B., FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Vet. Res.** 30: 259-284, 1999.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 142-201, 1998.
- NAVARRO-GARCIA, F., ESLAVA, C., VILLASECA, J.M., LOPEZ-REVILLA, R., CZECZULIN J.R., SRINIVAS, S., NATARO, J.P., CRAVIOTO, A. In vitro effect of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 66: 3149-3154, 1998.
- OJENIYI, B., AHRENS, P., MEYLING, A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence with piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay polymerase chain reaction and phenotype assays. **J. Vet. Med. B.** 41: 49-59, 1994.
- OKUDA, J., FUKUMOTO, M., TAKEDA, Y., NISHIBUCHI, M. Examination of diarrheagenicity of cytotoxic distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. **Infect. Immun.** 65: 428-433, 1997.
- ORDEN, J. A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A., CID, D., GARCÍA, S., DE LA FUENTE, R. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. **Vet. Microbiol.** 66: 265 – 273, 1999.

- ORDEN, J.A., CID, D., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., GARCÍA, S., MARTÍNEZ, S., DE LA FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. **J. Appl. Microbiol.** 93: 29-35, 2002.
- OSEK, J., GALLIEN, P., PROTZ, D. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. **Comp. Immun. Microbiol. Infect.** 23: 267-276, 2000.
- OSEK, J., WINIARCZYK, S. Prevalence of *eae* and Shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy calves. **J. Vet. Med.** 48: 67-72, 2001.
- PATON, A. W., PATON, J. C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **J. Clin. Microbiol.** 36: 598-602, 1998.
- PATON, 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. **Infect. Immun.** 69: 6999-7009, 2001.
- PICKETT, C.L., WHITEHOUSE, C.A. The cytolethal distending toxin family. **Trends in Microbiol.** 7: 292-297, 1999.

- PICKETT, C.L., LEE, R.B., EYIGOR, A., ELITZUR, B., FOX, E.M., STROCKBINE, N.A.
Patterns of variations in *Escherichia coli* strains that produce cytolethal distending toxin.
Infect. Immun. 72: 684-690, 2004.
- PRADEL, N., LIVRELLI, V., DE CHAMPS, C., PALCOUX, J.B., REYNALD, A., SCHEUTZ,
F., JOLY, B., FORESTIER, C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing
Escherichia coli isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study
in France. **J. Clin. Microbiol.** 38: 1023-1031, 2000.
- ROOSSENDAAL, B., GAASTRA, W., GRAAF, F. K. The nucleotide sequence of the genes
encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 22:
253–258, 1984.
- SALVADORI, M.R., VALADARES, G.F., LEITE, D.S., BLANCO, J., YANO, T. Virulence
factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**
34: 230-235, 2003.
- SAVARINO, S.J., FASANO, A., ROBERTSON, D.C., LEVINE, M.M. Enteroaggregative
Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an “in vitro” rabbit
intestinal model. **J. Clin. Invest.** 87: 1450-1455, 1991.
- SCHULTSZ, C., POOL, G J., VAN KETEL, R., DE WEVER, B., SPEELMAN, P., DANKERT,
J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively
labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.** 32: 2393–2397, 1994.

- SILVA, A.S., LEITE, D. S. Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. **Vet. Microbiol.** 89: 195–199, 2002.
- SMITH, H.W., HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. **J. Pathol. Bacteriol.** 93: 531-543, 1967.
- SO, M., McCARTY, B. J. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77: 4011–4015, 1980.
- SZALO, I.M., GOFFMAN, F., PIRSON, V., PIÉRARD, D., BALL, H., MAINIL, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding putative adhesins of human EHEC strains. **Res. Microbiol.**, 153: 653-658, 2002.
- TRABULSI, L.R., KELLER, R., GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 8: 508-513, 2002.
- UGRINOVICH, L.A., ÁVILA, F.A., OLIVEIRA, M.N., CASTRO, A.F.P. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, 32: 289-291, 2002.

- UGRINOVICH, L.A. Isolamento e caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros no Estado de São Paulo, Brasil. Campinas, 2004. 89p. **Dissertação (Doutorado)** Universidade Estadual de Campinas.
- URDAHL, A. M., BEUTIN, L., SKJERVE, E., ZIMMERMANN, S., WASTESON, Y. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. **J. Appl. Microbiol.** 95: 92-101, 2003.
- VALADARES, G. F., SOUZA, A. S., LEITE, D. S. Frequência de isolamento do fator de colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia e sua associação com outros fatores de virulência. **In: Res. XX Congr. Brasileiro de Microbiologia**, Salvador, Brasil, p. 167, 1999.
- VALADARES, G.F. Detecção do Fator de Colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia e sua associação com fatores de virulência. Campinas, 2000. 81p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas.
- VAN BOST, S., BÂBE, M.H., JACQUEMIN, E., MAINIL, J. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. **Vet Microbiol.** 82: 311-320, 2001.
- VAZ, T.M., IRINO, K., KATO, M.A., DIAS, A.M., GOMES, T.A.T., MEDEIROS, M.I., ROCHA, M.M., GUTH, B.E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-

- producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.** 42: 903-905, 2004.
- WALTNER-TOEWS, D., MARTIN, S.W., MEEK, A.H. The effect of early calthood status on survivorship and age at first calving. **Can. J. Vet. Res.** 50: 314-317, 1986.
- WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRÜCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., BALJER, G. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2980–2984, 1996.
- YAMAMOTO, T., ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.** 64: 1441 – 1445, 1996.
- YU, J., KAPER, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.** 6: 411-417, 1992.
- ZWEIFEL, C., SCHUMACHER, S., BLANCO, M., BLANCO, J.E., TASARA, T., BLANCO, J., STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. **Vet. Microbiol.**, 105: 37-45, 2005.