

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE ENTEROHEMOLISINAS EM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS ISOLADAS DE AMOSTRAS FECAIS

Fernanda Kussi¹, Mário Rene Sibut Mares de Souza²

Resumo

Várias bactérias constituem a flora normal do intestino humano e entre elas está a principal que é a *Escherichia coli*. Certas cepas de bactérias Gram-negativas (dentre elas a própria *E. coli*) são produtoras de toxinas patogênicas como a toxina *Shiga* que causam diarreias, lisam células de vários órgãos e em casos graves, podem causar a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) sendo fatal por levar a falência dos rins. Estas cepas enteropatogênicas podem ser reconhecidas pela expressão de enterohemolisinas (gene *EHly*) e esta característica fenotípica pode ser útil para discriminar cepas patogênicas das cepas da microbiota normal do intestino. A infecção se dá através de alimentos, água ou da carne bovina contaminada com fezes de bovinos e animais domésticos, pois esses animais são reservatórios naturais da *E. coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC). O objetivo deste trabalho foi determinar a presença de cepas produtoras de enterohemolisina em fezes não diarreicas analisando portadores assintomáticos. Para a produção deste trabalho foi realizada revisão da literatura científica e análise experimental. As 8 cepas fecais de bactérias Gram-negativas isoladas no MacConkey foram passadas para o Mueller Hinton suplementado com sangue de carneiro e cálcio para a visualização da enterohemolisina. Nenhuma delas apresentaram evidências de serem produtoras de enterohemolisinas. Assim, o resultado deveria ser confirmado através de técnicas moleculares. Concluiu-se que a vantagem da metodologia utilizada é a baixa complexidade e baixo custo em relação ao método molecular - PCR. O tema necessita de mais estudos que contribuam para o desenvolvimento de métodos na detecção de enterohemolisinas para que seja inserido na rotina laboratorial a fim de aumentar a sensibilidade de detecção de cepas suspeitas ou associadas a gastroenterites.

Palavras-chave: Enterohemolisina. Hemolisina. STEC. *Shiga*. *Escherichia coli*.

Abstract

Several bacteria constitute the normal flora of the human gut, and among them is the main one, *Escherichia coli*. Certain strains of Gram-negative bacteria (including *E. coli* itself) produce pathogenic toxins like the *Shiga* toxin that cause diarrhea, lyse cells from various organs and in severe cases can cause Uremic Hemolytic Syndrome (HUS) being fatal as it leads to kidney failure. These enteropathogenic strains can be recognized by the expression of enterohemolysins (gene *EHly*) and this phenotypic characteristic can be useful for discriminating pathogenic strains from normal gut microbiota strains. Infection occurs through contaminated food, water or beef contaminated with feces from cattle and domestic animals, as these animals are natural reservoirs of *E. coli* toxin producer *Shiga* (STEC). The objective of this study was to determine the presence of enterohemolysin-producing strains in non-diarrheal feces by analyzing asymptomatic carriers. For the production of this work a review of the scientific literature and experimental analysis was performed. The 8 isolated Gram-negative bacterial fecal strains in MacConkey were passed to Mueller Hinton supplemented with sheep's blood and calcium for visualization of enterohemolysin. None of them showed evidence of producing enterohemolysins. Thus, the result should be confirmed by molecular techniques. It was concluded that the advantage of the methodology used is the low complexity and low cost in relation to the molecular method - PCR. The theme needs further studies that contribute to the development of methods detection of enterohemolysins to be inserted in the laboratory routine in order to increase the sensitivity of detecting strains suspected or associated with gastroenteritis.

Keywords: Enterohemolysin. Hemolysin. STEC. *Shiga*; *Escherichia coli*.

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. fernandakussi@gmail.com

² Biólogo, Professor Mestre, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. mario.rene@utp.br

Introdução

A gastroenterite é uma síndrome infecciosa de grande impacto em saúde pública. A etiologia desta síndrome é bastante diversa, entretanto, bactérias produtoras de enterohemolisinas estão entre as de grande incidência e morbimortalidade. Assim, a detecção fenotípica dessa característica seria de grande auxílio no diagnóstico da gastroenterite. Métodos moleculares podem ajudar neste propósito, porém, são caros e de alta complexidade operacional.

Define-se enterohemolisinas como sendo toxinas proteicas sintetizadas por bactérias patogênicas que são geralmente liberadas para o meio extracelular danificando células. Tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas podem produzi-las que, ao contrário de outras toxinas, não são internalizadas pelas células alvo. Elas atuam sobre as membranas celulares de eritrócitos, mas também de fibroblastos, células do miocárdio, plaquetas, monócitos, granulócitos e células endoteliais conforme menciona JÜRGENS *et al.* (2002).

As *E. coli* são bactérias Gram-negativas, frequentemente isoladas das fezes, constituem uma parte da microbiota normal, ou seja, não causam doença em seus hospedeiros, porém, algumas de suas linhagens são patogênicas cuja diferenciação se dá através dos fatores de virulência presentes (CASTILHONE 2007; COURA *et al.*, 2014). Segundo Stromberg *et al.* (2018) muitas cepas são inofensivas, entretanto, algumas podem causar doenças em humanos e animais.

Com o passar dos anos, surgiu um tipo de *E. coli* que causa colite hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) chamada de *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga-like* (STEC) (STELLA, 2009). De acordo com Cap *et al.* (2019) a contaminação é associada ao consumo de carne crua ou malcozida.

Segundo Beutin (1991) um tipo diferente de hemolisina foi encontrada em cepas de *E. coli* isoladas de amostras fecais de bebês com gastroenterite e foi nomeada como enterohemolisina já que a maioria das cepas que a produzem pertencem a grupos enteropatogênicos. O autor também cita a toxina *Shiga* como sendo um fator que está intimamente associado a produção de enterohemolisina em *E. coli*.

Curiosamente, Persad (2014) descreveu a possibilidade de animais de estimação estarem contaminados, (especialmente cães e gatos) e transmitirem STEC para os humanos, pois sorotipos foram recuperados a partir de suas fezes.

Além disso, a contaminação também se dá através de alimentos e água contendo a toxina que de acordo com Sacerdoti *et al.* (2018) causa uma complicação sistêmica que, após ser ingerido e colonizar o intestino, induz a morte de células por inibir síntese proteica causando a morte celular.

Não somente a toxina *Shiga* é sintetizada pelo STEC que, segundo SOUZA *et al.* (2010), é considerada como o principal fator de virulência. O autor relata que existe um fator de virulência acessório da *Shiga* que forma poros e que é codificada por um gene transmitido por plasmídeo (*ehxA*) conhecida como enterohemolisina que, ao que tudo indica, é ela que aumenta a capacidade patológica da STEC em causar complicações extraintestinais.

A enterohemolisina é codificada por dois genes: *hlyA* ou *ehxA* que de acordo com TARABEES *et al.* (2018) aumentam o efeito da toxina *shiga*. A *E. coli* produz diversos tipos de hemolisinas, entre elas está a enterohemolisina (*EHly*) que pode ser detectada em placas de ágar sangue contendo eritrócitos lavados sendo associada com doença entérica conforme relata Figueirêdo *et al.* (2003a). Cookson *et al.* (2007) define enterohemolisina como sendo uma toxina que possui grande facilidade em causar hemólise, sendo codificada por plasmídeo.

De modo interessante, segundo May *et al.* 2000, o efeito tóxico nos eritrócitos é dependente de cálcio e está relacionado com a produção de poros transmembranares. Herlax (2002) também cita a importância da presença do cálcio na indução da lise pois, segundo ele, somente a ligação da toxina à membrana não é suficiente.

A patogênese da STEC causa insuficiência renal, desidratação, diarreia e, conseqüentemente, a morte conforme relata Jeong *et al.* (2018).

Por tanto, o objetivo dessa pesquisa foi verificar se nas amostras fecais normais (não diarreicas) do laboratório de estágio da Universidade Tuiuti do Paraná apresentaram alguma capa Gram-negativa produtora de enterohemolisina nas placas de ágar Mueller Hinton suplementadas com sangue a fim de demonstrar a existência do fator patogênico bacteriano em pacientes assintomáticos.

Materiais e Métodos

Preparo do meio Ágar Mueller Hinton e adição do cloreto de cálcio (CaCl₂)

Seguiu-se as instruções de preparo do meio, porém utilizando metade do que se pedia para ter menos placas. Logo após, foi adicionado 50 mL o cloreto de cálcio de concentração de 0,01 mol e depois o material foi autoclavado.

Adição do sangue de carneiro desfibrinado e plaqueamento

Após esterilização do meio base, em autoclave, foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro, ao meio resfriado a 50°C. Em seguida, o meio foi distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas.

Semeadura das amostras em placas de MacConkey

As amostras fecais foram fornecidas por laboratórios colaboradores do laboratório-escola de análises clínicas do estágio na Universidade Tuiuti do Paraná do curso de Biomedicina. Foram selecionadas 12 amostras cujos microrganismos presentes foram cultivados através da técnica de semeadura por esgotamento em placas de MacConkey. Das 12 placas, somente em 8 sucedeu crescimento.

Semeadura das bactérias em placas de Ágar Mueller Hinton suplementadas com sangue e cálcio (Agar Sangue)

Foram isoladas as doze colônias em MacConkey e, depois transferidas para a de Mueller Hinton através da inoculação em profundidade do meio para a esperada verificação da hemólise. Após inoculação as placas foram incubadas em estufa com temperatura de 36°C por 24 a 48 horas.

Resultados e Discussão

Estudos publicados na literatura relatam que bactérias patogênicas produtoras de enterohemolisinas (especialmente a *Shiga*) é considerada por vários países um problema de saúde pública, pois é responsável por diversas doenças que podem levar a morte. Em decorrência desse fato, vários pesquisadores tentam entender como se dá sua patogenicidade nos seres humanos, já que, em muitas espécies de animais essas bactérias fazem parte da flora normal.

Nesse trabalho, pesquisou-se se haveria alguma cepa hemolítica em fezes não diarreicas fugindo do perfil de pesquisa, pois a maioria dos pesquisadores utilizavam amostras diarreicas suspeitas como mostra Bonyadian *et al.* (2010) que a maioria das informações veio da inspeção de surtos.

Porém, exceções na literatura foram encontradas tais como Urdahl *et al.* (2012) que investigou se nas amostras fecais de voluntários assintomáticos poderiam possuir genes *STX* (que codificam toxinas *Shiga*) assim como encontrado nas amostras de pessoas com doença gastrointestinal e, concluiu que não é incomum encontrar. Até propôs, a partir dos resultados de sua pesquisa, que as bactérias podem consistir uma parte da flora microbiana intestinal normal em humanos.

Harries *et al.* (2016) encontrou STEC em amostras de fezes não diarreicas de crianças relatando uma percentagem elevada de portadores assintomáticos. Também Lozer *et al.* (2013) estudou a prevalência de diferentes categorias de *E. coli* em crianças sintomáticas e assintomáticas no sudeste do Brasil. A STEC se apresenta variável, ora assintomática, ora diarreica acompanhada de sangue e complicações fatais como a SHU (GILMOUR *et al.* 2009).

Balashova *et al.* (2006) descreveu a existência de três tipos de hemólise que podem aparecer na placa suplementada com sangue, ou seja, três fenótipos denominados de alfa, beta e gama hemólise. A alfa-hemólise se apresenta pela cor verde-amarela ao redor das colônias devido a ação do peróxido, pois as bactérias não rompem totalmente as hemácias. Já a beta-hemólise, expressa-se com halos claros ao redor das colônias devido a hemólise total dos eritrócitos. Por fim, a gama-hemólise é identificada pela falta de qualquer tipo de hemólise.

A enterohemolisina pode ser facilmente detectada em placas de ágar sangue diferentemente da alfa hemolisina, pois a zona de hemólise se apresenta menor, porém são mais turvas (BEUTIN 1991).

Assim, nessa pesquisa, verificou-se que nas duas placas preparadas e utilizadas de Mueller Hinton, não foi observada presença hemolítica demonstrando que nas fezes pesquisadas os

pacientes não portavam nenhuma cepa com essa enzima conforme mostra a figura 1. Acredita-se que a falta de positividade nessa pesquisa seja pelo número baixo de amostras utilizadas, pois Cookson *et al.* (2007) utilizou 191 amostras de fezes em sua pesquisa.

Todas as cepas isoladas no ágar MacConkey foram inoculadas em duplicada no ágar sangue, com técnica da perfuração do meio (inoculação profunda), estando uma do lado da outra a fim de garantir o crescimento.



Fig. 1 – ágar Mueller Hinton, meio perfurado com bactérias Gram-negativas demonstrando a formação de gama hemólise (ausência de hemólise).

Fonte: o autor.

De acordo com Toni *et al.* (2009) a Argentina tem as maiores taxas globais de isolamento de STEC propiciando, assim seu aparecimento no estado do Paraná por fazer fronteira, porém, são poucos os laboratórios capacitados em realizar a detecção de STEC (cepas patogênicas) assim, não se conhece a prevalência deles no Brasil.

Como Gilmour *et al.* (2009) escreveu, ainda hoje não há métodos laboratoriais simples para detectar e isolar STEC, pois a maioria das estirpes são identificadas com base na característica fenotípica apresentada na placa, porém, a maioria dos sorogrupos patogênicos não podem ser diferenciados dos benignos durante a cultura microbiana básica, assim, não existe um teste fenotípico que diferencie das não-0157 STEC nas fezes já que o ágar MacConkey de sorbitol (SMAC) só detecta STEC 0157 pela não fermentação do sorbitol.

Existem ensaios que podem ser realizados através das fezes, porém possuem pouca sensibilidade, são caros e só detectam a *E. coli* 0157. O mais sensível para detectar toxinas shiga seria o PCR, mas somente alguns laboratórios possuem o equipamento por não fazer parte dos testes de rotina, pois, como cita KEHL (2002) não existem testes comercialmente disponíveis a fim de detectar as toxinas *Shiga*.

A enterohemolisina é um de vários fatores de virulência expressos pela STEC conforme relata Kang *et al.* (2014). A *Escherichia coli* sintetiza diversos tipos de hemolisinas entre elas está a enterohemolisina (*EHly*) que é associada a doenças entéricas e só é detectada em placas de ágar-sangue cujas hemácias devem estar lavadas, pois segundo Figueirêdo *et al.*

(2003b) existe um fator no soro que impede a ação hemolítica da toxina que, segundo ele, seria o colesterol.

Presume-se que a enterohemolisina não seja totalmente virulenta, pois garante a sobrevivência bacteriana fora do ambiente gastrointestinal onde é necessária a aquisição de ferro Castilhone (2007).

Segundo Sobieszczkańska (2007) a enterohemolisina é a hemolisina mais conhecida da bactéria *E. coli* e que faz parte das citotoxinas produzidas por vários patógenos gram negativos sendo encontrada também nas infecções extra-intestinais como o sistema urinário ou septicemia. O autor também cita que o gene *EHly* é o fator bacteriano que desencadeia diarreia e alterações significativas na mucosa intestinal, causando inflamação, edema e necrose no local. A partir da pesquisa realizada pelo autor, cepas que sintetizam esse gene causaram uma inflamação muito mais grave do intestino delgado e grosso quando comparado com cepas que não sintetizam.

Assim, nessa pesquisa, foram utilizadas hemácias lavadas de ovelha desfibrinadas a 5% e cloreto de cálcio (CaCl₂) a fim de verificar a presença da enterohemolisina assim como fez SOUZA *et al.* (2010).

Os artigos relatam a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença da enterohemolisina pois, como na identificação de qualquer hemolisina, eles não se baseiam pela característica fenotípica apresentada na placa de ágar sangue ou pela ausência da mesma. Assim, podemos dizer que a PCR é um teste confirmatório. Pois, Cookson *et al.* (2007) achou 2 cepas de STEC O111:H que apresentaram o gene *ehxA* (produtora de enterohemolisina) mas que não expressaram o fenótipo hemolítico.

Conclusão

O estudo evidenciou que nas amostras pesquisadas não apresentaram nenhuma presença de BGN produtor de enterohemolisina. Embora não tenha tido êxito no isolamento, é desejável que se pesquise em número maior de amostras, pois pode haver na população indivíduos portadores de cepas com fatores de virulência como enterohemolisinas. Métodos fenotípicos são mais acessíveis e podem ser úteis na detecção de cepas com essa característica.

Além disso, deveria existir algum teste para ser implementado na rotina laboratorial para a detecção de bactérias que produzem toxina **Shiga** e enterohemolisina, pois como foi demonstrado, são bactérias patogênicas que estão presentes na vida das pessoas.

Na área da biomedicina, esse ensaio é relevante, pois como umas das áreas de atuação desse curso é a pesquisa, esse trabalho contribui para o enriquecimento da literatura científica e para o conhecimento de outros profissionais do setor da saúde, não só de alunos e profissionais de biomedicina, podendo servir como material de estudo sobre essa enzima bacteriana que ainda deve ser muito pesquisada.

Referências

- BALASHOVA NV, CROSBY JA, AL GHOFAILY L, KACHLANY SC. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. Apr;74(4):2015-21. 2006.
- BEUTIN L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *MedMicrobiol Immunol*.180(4):167-82. 1991.
- BONYADIAN M, MOMTAZ H, RAHIMI E, HABIBIAN R, YAZDANI A, ZAMANI M. Identification & characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from patients with diarrhoea in Iran. *Indian J Med Res*.Sep;132:328-31. 2010.
- CAP M, CARBONARI CC, D'ASTEK BA, ZOLEZZI G, DEZA N, PALLADINO MP, MASANA M, CHINEN I, RIVAS M. Frequency, characterization and genotypic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef slaughterhouses of Argentina. *Rev Argent Microbiol*. Jan - Mar;51(1):32-38. 2019.
- CASTILHONE, CAROLINE ARANTES MAGALHÃES. Enterohemolisina de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: novas características fenotípicas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- COOKSON AL, BENNETT J, THOMSON-CARTER F, ATTWOOD GT. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Appl Environ Microbiol*. Oct;73(20):6360-9. 2007.
- COURA, FERNANDA M.; LAGE, ANDREY P.; HEINEMANN, MARCOS B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 9, p. 811-818, Sept. 2014.
- FIGUEIRÊDO PM, CATANI CF, YANO T. Serum high-density lipoprotein (HDL) inhibits in vitro enterohemolysin (EHly) activity produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Aug 18;38(1):53-7. 2003a.
- FIGUEIRÊDO, P.M.S.; CATANI, C.F.; YANO, T. Thiol-independent activity of a cholesterol-binding enterohemolysin produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 36, n. 11, p. 1495-1499, Nov. 2003b.
- GILMOUR MW, CHUI L, CHIU T, TRACZ DM, HAGEDORN K, TSCHETTER L, TABOR H, NG LK, LOUIE M. Isolation and detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in clinical stool samples using conventional and molecular methods. *J Med Microbiol*. Jul;58(Pt 7):905-11. 2009.
- HARRIES M, DREESMAN J, RETTENBACHER-RIEFLER S, MERTENS E. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in asymptomatic nursery children in Lower Saxony (Germany), 2014. *Epidemiol Infect*. Dec;144(16):3540-3548. 2016.
- HERLAX, VANESA & BAKAS, LAURA. Aplicaciones terapéuticas de toxinas líticas formadoras de poros: potencialidades de α -hemolisina de *Escherichia coli*. *Fundación Medicina Buenos Aires*. 66-72 2002.
- JEONG YJ, PARK SK, YOON SJ, PARK YJ, LEE MS. Experimental In Vivo Models of Bacterial Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *J Microbiol Biotechnol*. Sep 28;28(9):1413-1425. 2018.

- JÜRGENS D, OZEL M, TAKAISI-KIKUNI NB. Production and characterization of Escherichia coli enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Cell Biol Int.* 26(2):175-86. 2002.
- KANG E, HWANG SY, KWON KH, KIM KY, KIM JH, PARK YH. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) from cattle in Korea between 2010 and 2011. *J Vet Sci.* 2014;15(3):369–379. 2014.
- KEHL SC. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic Escherichia coli infections. *J Clin Microbiol.* 40(8):2711–2715. 2002.
- LOZER DM, SOUZA TB, MONFARDINI MV, VICENTINI F, KITAGAWA SS, SCALETSKY IC, SPANO LC. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infectious Diseases.* Sep 8; 13:418.2013.
- MAY AK, GLEASON TG, SAWYER RG, PRUETT TL. Contribution of Escherichia coli alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infect Immun.* 68(1):176–183. 2000.
- PERSAD AK, LEJEUNE JT. Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. *Microbiol Spectr.* Aug;2(4): EHEC-0027. 2014.
- SACERDOTI F, SCALISE ML, BURDET J, AMARAL MM, FRANCHI AM, IBARRA C. Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections during Pregnancy. *Microorganisms MDPI.* Oct 23;6(4). 2018.
- SOBIESZCZAŃSKA BM. Hemolizyny Escherichia coli. *Postępy Mikrobiologii.* 343- 353. 2007.
- SOUZA MR, KLASSEN G, TONI FD, RIGO LU, HENKES C, PIGATTO CP, DALAGASSA CDE B, FADEL-PICHETH CM. Biochemical properties, enterohaemolysin production and plasmid carriage of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* May;105(3):318-21. 2010.
- STELLA, ARIEL EURIDES. Fatores de virulência em isolados de Escherichia coli provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. 2009. xiii, 70 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.
- STROMBERG ZR, REDWEIK GAJ, MELLATA M. Detection, Prevalence, and Pathogenicity of Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from Cattle Hides and Carcasses. *Foodborne Pathog Dis.* Mar;15(3):119-131. 2018.
- TARABEES, REDA & ELSAYED, MOHAMED. Virulence repertoire and antimicrobial resistance profile of shiga toxin producing E. coli isolated from some sheep and goat farms from Al-buhayra Egypt. *Pakistan Veterinary Journal.* August; 38(4): 429-433. 2018.
- TONI F, DE SOUZA EM, PEDROSA FO, KLASSEN G, IRINO K, UN RIGO L, STEFFENS MB, FIALHO OB, FARAH SM, FADEL-PICHETH CM. A prospective study on Shiga toxin-producing Escherichia coli in children with diarrhea in Paraná State, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* May;48(5):645-7. 2009.
- URDAHL AM, SOLHEIM HT, VOLD L, HASSELTVEDT V, WASTESON Y. Shiga toxin-encoding genes (stx genes) in human faecal samples. *APMIS.* Mar;121(3):202- 10. 2012.