UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carne
moída comercializada na cidade de São Paulo, SP

Adriana Lucatelli

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Mariza Landgraf

SÃO PAULO
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carne
moída comercializada na cidade de São Paulo, SP

Adriana Lucatelli

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Mariza Landgraf

SÃO PAULO
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L933e	Lucatelli, Adriana
	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP / Adriana Lucatelli.
	-- São Paulo, 2012.
	56p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
	Orientador: Landgraf, Mariza
	1. Microbiologia de alimentos 2. Carne bovina : Ciência dos alimentos 3. Biologia molecular I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.
	664.07 CDD

Adriana Lucatelli

Escherichia coli produtora de toxina de Shiga em carne moída
comercializada na cidade de São Paulo, SP.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª. Dra. Mariza Landgraf
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2012.

A Deus, pela oportunidade de estar num lugar onde poucos alcançam, por me fazer perseverar mesmo nos momentos difíceis, por me amparar e me presentear com o êxito de mais uma realização.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Mariza Landgraf pelos ensinamentos com carinho e paciência, pela confiança, incentivo e amizade.

À Prof. Dra. Maria Teresa Destro pelos ensinamentos, assessoria, sugestões, confiança e amizade.

À Prof. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pela amizade e ajuda.

À Prof. Dra. Vera Lúcia Mores Rall, da UNESP de Botucatu, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À Prof. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth, da Unifesp, pela disponibilização de cepas padrão, auxílio científico em seu laboratório, confiança, interesse e amizade.

À Prof. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, do Instituto Butantan, pela disponibilização de cepas padrão e amizade.

À Dra. Tânia Maria Ibelli Vaz, do Instituto Adolfo Lutz, pela sua contribuição e sorotipagem de cepas.

Aos meus pais pela vida gerada, pelo amor, apoio, incentivo, confiança, dedicação, torcida, sacrifício e orações por mim, neste e em todos os momentos de minha vida. Sem vocês esse projeto não seria realizado.

Ao meu esposo que sempre me apoiou e incentivou, participando com amor e paciência de todos os momentos felizes ou difíceis de minha vida e formação. Obrigada pelas orações!

À minha irmã pelo amor, amizade e incentivo.

À minha avó Cristina pelo amor, carinho, dedicação e muitas orações.

À minha avó Olinda (*in memoriam*) pelo amor, carinho e dedicação.

Ao meu avô José pelo amor, carinho, amizade, dedicação, companheirismo e exemplo de ser humano.

À minha tia Maria Helena, pelo amor, dedicação e ajuda em minha vida e formação.

Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre torceram por mim e me apoiaram para alcançar mais esse objetivo.

Aos meus cunhados pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos Alini, Paula, Ana, Roger, André, Márcia e Ricardo pelo carinho, apoio, incentivo e torcida por mim.

Aos meus amigos do laboratório Verena, Carol, Priscila P., Kátia, Lúcia, Crystina, Matheus, Rafael, Patrícia, Haíssa, Vanessa, Slavi, Anderson, Janaína,

Isabela, Aline, Priscila C., Maria Fernanda e Vinícius pela amizade, conselhos e colaboração.

Aos motoristas Luís, Gerson e João pela enorme colaboração nas coletas.

À Mônica, Cleonice e Roberta, da secretaria do departamento, e ao Edilson, Jorge e Elaine, da secretaria de Pós-Graduação, por todo o auxílio despendido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo e pelo apoio científico e financeiro para o desenvolvimento deste projeto e para o meu desenvolvimento científico.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto e pela bolsa concedida.

À todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

LUCATELLI, A. ***Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP.** 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Apesar de *Escherichia coli* O157:H7 ainda ser considerado o principal sorotipo envolvido com surtos de enfermidades veiculadas por alimentos entre as *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC), outros sorogrupos estão ganhando importância, como O26, O45, O103, O111, O121 e O145, que estão sendo denominados de “*Top Six STEC non O157*”. As STEC são responsáveis por sintomas que variam de uma simples diarreia até diarreia sanguinolenta, que pode evoluir ainda para síndrome hemolítica urêmica e púrpura trombótica trombocitopênica, podendo ocasionar danos crônicos como falência renal e levar a óbito. Para tanto, apresentam diversos fatores de virulência, entre eles, as toxinas de Shiga (Stx) ou verotoxinas (Vtx). Os veículos destes micro-organismos são diversos alimentos, sendo o principal deles, as carnes moídas. Apesar da importância da carne moída como veículo transmissor de STEC, pouco se conhece sobre a sua presença nesse alimento comercializado na cidade de São Paulo, SP. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de STEC em carne moída comercializada no varejo da cidade de São Paulo e caracterizar tais isolados quanto à presença dos seguintes fatores de virulência: *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehx*. Foram coletadas 248 amostras em diferentes bairros da cidade de São Paulo. Para a detecção de *E. coli* sorogrupo O157 foi utilizada a metodologia ISO 16654 e para a detecção dos sorogrupos O103, O111, O145 e O26 foi empregada a metodologia descrita pelo Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals (NRM 006). Uma amostra de carne moída (0,4%) apresentou o micro-organismo pesquisado. A identificação genotípica e bioquímica caracterizou esse isolado como STEC O157:H7, portador de todos os fatores de virulência pesquisados: *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehx*. Foi constatada, também, a expressão das proteínas *stx* em células Vero. Esse é o primeiro relato da presença de *E. coli* O157:H7 produtora de toxina de Shiga em carne moída no Brasil.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, STEC, carne moída.

ABSTRACT

LUCATELLI, A. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef at retail level at Sao Paulo city, Brazil.** 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Faculty of Pharmaceutical Science, Sao Paulo University, Sao Paulo, 2012.

Although *Escherichia coli* O157:H7 is still considered the most important serotype involved in foodborne disease outbreaks among Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), other serogroups are receiving more attention such as O26, O45, O103, O111, O121 and O145, that are being called the “Top Six STEC non O157”. STEC are responsible for symptoms ranging from simple diarrhea to bloody diarrhea, which can further evolve to hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura, which may cause damage such as chronic renal failure and lead to death. To do so, they have several virulence factors, including the Shiga toxins (Stx) or verotoxins (Vtx). The vehicles of these microorganisms are many foods, most notably, the ground beef. Despite the importance of ground beef as a vehicle for transmitting STEC, little is known about their presence in this kind of food sold in São Paulo, SP. Therefore, the objective of this study was to investigate the presence of STEC in ground beef sold at retail level in Sao Paulo city and characterize the isolates for the presence of the following virulence factors: *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *ehx*. 248 samples were collected in different districts of Sao Paulo city. For the detection of *E. coli* O157 serogroup the methodology ISO 16654 was used and for the detection of serogroups O103, O111, O145 and O26 the methodology described by the Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals (NRM 006) was used. One sample of ground beef (0.4%) showed the presence of the microorganism studied. The biochemical and genotypical identification characterized this isolate as STEC O157:H7, carrying all of the investigated virulence factors: *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *ehx*. The expression of *stx* proteins in Vero cells was also observed. This is the first report on the isolation of *E. coli* O157:H7 Shiga toxin-producing from ground beef in Brazil.

Keywords: *Escherichia coli*, STEC, ground beef.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção mundial de carne bovina	10
Tabela 2	Exportação mundial de carne bovina	10
Tabela 3	Consumo mundial de carne bovina	11
Tabela 4	Amostragem na zona norte de São Paulo.	20
Tabela 5	Amostragem na zona sul de São Paulo.	21
Tabela 6	Amostragem na zona leste de São Paulo.	22
Tabela 7	Amostragem na zona oeste de São Paulo.	23
Tabela 8	Amostragem na zona central de São Paulo.	23
Tabela 9	Iniciadores utilizados na reação de PCR.	31
Tabela 10	Classificação e origem das amostras de carne moída analisadas.	34
Tabela 11	Momento da moagem das amostras de carne moída analisadas.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da cidade de São Paulo.	15
Figura 2	Mapa da região central da cidade de São Paulo.	16
Figura 3	Mapa da zona norte da cidade de São Paulo.	16
Figura 4	Mapa da zona sul da cidade de São Paulo.	17
Figura 5	Mapa da zona leste da cidade de São Paulo.	18
Figura 6	Mapa da zona oeste da cidade de São Paulo.	18
Figura 7	Representação esquemática do processo de separação imunomagnética.	26
Figura 8	Esquema metodológico da pesquisa de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga do sorotipo O157:H7 (ISO 16654).	27
Figura 9	Esquema metodológico da pesquisa de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga de sorotipos não-O157 (<i>Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals</i> NRM 006).	28
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de <i>fliC_{H7}</i> (Gannon <i>et al.</i> , 1997) e <i>rfb_{O157}</i> (Paton e Paton, 1998).	36
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de <i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> e <i>eae</i> realizada segundo Feng e Monday (2000).	36

Figura 12	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de <i>uid</i> realizada segundo Feng e Monday (2000), com modificações.	37
Figura 13	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de <i>ehx</i> realizada segundo Feng e Monday (2000), com modificações.	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Composição da solução tampão – pH 7,4	56
Anexo B	Composição da solução fosfato salina tamponada – pH 7,3	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina de Shiga	2
1.3 Infecção por STEC.....	4
1.4 Patogenicidade de STEC.....	6
1.5 Carne e STEC	8
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Cepas utilizadas.....	13
3.1.2 Amostragem	13
3.1.3 Coleta das amostras	19
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (ISO 16654) e <i>Surveillance Group for Diseases and Infectious of Animals</i> NRM 006)	24
3.2.2 Pesquisa das sequências genéticas para <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eae</i> , <i>uid</i> , <i>rfb</i> _{O157} e <i>fliC</i> _{H7}	29
3.2.3 Análise do produto amplificado	30
3.2.4 Identificação bioquímica.....	31
3.2.5 Teste de citotoxicidade em células Vero	32
3.2.6 Pesquisa da atividade enterohemolítica	33
3.2.7 Determinação dos sorotipos.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1- INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um micro-organismo pertencente à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e não esporogênicos. É uma das espécies bacterianas mais versáteis e mais estudadas.

E. coli é habitante da microbiota intestinal do ser humano e outros animais de sangue quente. Enquanto algumas cepas contribuem na fisiologia intestinal de seus hospedeiros, outras apresentam fatores de virulência que as tornam capazes de desencadear infecções no organismo hospedeiro (Meng *et al.*, 2007).

A presença de *E. coli* em um alimento é um dado muito importante, pois, por estar presente no intestino de animais de sangue quente é um indicador de contaminação fecal do produto. Sua presença no alimento deve ser analisada com cautela, pois além de indicador, a espécie pode compreender cepas patogênicas, comumente envolvidas em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) (Meng *et al.*, 2007).

Escherichia coli compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados com as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O, K e H, sendo que nem todas as cepas de *E. coli* apresentam os três tipos de antígenos simultaneamente (Franco e Landgraf, 1996).

A patogenicidade de *E. coli* é um mecanismo complexo, que envolve a expressão de diferentes fatores de virulência – como a produção de toxinas e adesinas – frequentemente codificados por genes presentes em elementos móveis, como plasmídeos e bacteriófagos. Dessa forma, cepas não patogênicas podem tornar-se patogênicas através da incorporação de material genético proveniente de cepas patogênicas (Kaper, 2005).

A maioria das cepas de *E. coli* não é patogênica. As enteropatogênicas são classificadas de acordo com seu mecanismo de patogenicidade em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Meng *et al.*, 2007), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) ou de verotoxinas (VTEC) (Guth, 2008) e as que causam infecções extra-intestinais - ExPEC - (Franzolin *et al.*, 2005).

Na área de alimentos, as *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) são o patotipo de maior importância e destaque devido ao seu envolvimento em surtos de ETA.

1.2 *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga

As STEC são capazes de produzir toxinas citotóxicas denominadas toxinas de Shiga. Essas citotoxinas são também denominadas verotoxinas, uma vez que sua atividade biológica pode ser observada em culturas de células Vero, originárias de rim de macaco verde africano, ou ainda de toxinas *Shiga-like*, já que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), causador da disenteria bacilar (Meng *et al.*, 2007).

As STEC são encontradas no intestino de diversas espécies de animais domésticos e silvestres de sangue quente, sendo os ruminantes os principais reservatórios (Kaper *et al.*, 2004). Tais animais, quando infectados, são na maioria dos casos assintomáticos (Money *et al.*, 2010).

As STEC podem causar diversas patologias no ser humano, que envolvem desde diarreias simples, não sanguinolentas, a colites hemorrágicas (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU), sendo esta última a principal causa de falência renal aguda em crianças, e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT), que acomete principalmente idosos (Paton e Paton, 1998; Potter *et al.*, 2004).

Um importante sorotipo de STEC é o O157:H7, que foi o primeiro a ser

associado com ETA entre esse grupo patogênico de *E. coli*. Por ter causado colite hemorrágica em indivíduos que ingeriram hambúrgueres mal cozidos de uma rede de *fast-food*, nos estados de Oregon e Michigan nos Estados Unidos, em 1982, esse sorotipo ficou conhecido como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Riley *et al.*, 1983). Atualmente, podem ser encontradas na literatura as mais diferentes denominações para esse grupo de *E. coli*, com alguns autores (Nataro e Kaper, 1998; Meng *et al.*, 2007) denominando-as de EHEC, outros (Paton e Paton, 1998) de STEC e outros ainda de VTEC (Karmali *et al.*, 2004).

Estudos posteriores identificaram este e outros micro-organismos similarmente produtores daquela toxina como a maior causa de síndrome urêmica hemolítica nos EUA (Law, 2000).

Durante muitos anos, *E. coli* O157:H7 foi considerado o principal sorotipo de STEC envolvido em surtos provocados por alimentos nos EUA, sendo que outros sorotipos vinham emergindo e ganhando importância como patógenos, sem, no entanto, receberem a devida atenção.

O panorama entre 1982 e 2002 mostrava que a maioria dos surtos por STEC era relacionado a carnes, leites não pasteurizados e derivados contaminados com STEC O157:H7, isto é, produtos de origem animal (Rangel *et al.*, 2005). Atualmente, as STEC estão envolvidas em surtos envolvendo alimentos não cárneos, como alface e espinafre (Feng *et al.*, 2011) e além disso, há a emergência de surtos causados por cepas não-O157.

Em recente estudo, Scallan *et al.* (2011) demonstraram que sorogrupos não-O157 estão atualmente mais envolvidos em surtos provocados por alimentos nos EUA do que propriamente o sorogrupo O157. Esse fato pode estar relacionado ao crescente estudo e desenvolvimento de metodologias capazes de identificar sorogrupos não-O157. Por outro lado, o índice de hospitalizações e mortes causadas por STEC permanece maior para o sorogrupo O157 do que para sorogrupos não-O157 (Scallan *et al.* 2011).

Em conjunto, tais observações sugerem que algumas cepas de STEC pertencentes a outros sorotipos diferentes de O157:H7 são potencialmente patogênicas e suas implicações vêm aumentando globalmente, sendo que os sorogrupos de STEC não-O157:H7 mais comumente associados a doenças humanas incluem O26, O103 e O111 (Fremaux *et al.*, 2007).

Essas observações corroboram as de pesquisadores europeus como Gerber *et al.* (2002), Tozzi *et al.* (2003) e Blanco *et al.* (2004) que constataram o aumento do envolvimento das cepas de STEC não-O157 em casos de diarreia sanguinolenta e SHU na Alemanha, Áustria, Espanha e Itália.

Na Inglaterra e no País de Gales, *E. coli* O157:H7 é responsável por 1% dos casos de doenças transmitidas por alimentos notificadas enquanto na Escócia esta taxa sobe para 3% (Money *et al.*, 2010).

Mais de 83% dos casos de síndrome hemolítica urêmica em crianças ocorrem após infecções por STEC (Gerber *et al.*, 2002). Na Argentina, a SHU é endêmica e aproximadamente 400 novos casos são anualmente notificados em unidades de nefrologia de hospitais (Signorini e Tarabla, 2010). Ainda neste país, 95% dos casos de SHU acometem crianças menores de cinco anos de idade, sendo que esta incidência foi de 12,2/100.000 no ano de 2002 (Signorini e Tarabla, 2010).

1.3 Infecção por STEC

A infecção por esse micro-organismo ocorre geralmente após a ingestão de alimentos (Gobert *et al.*, 2008; Viscardi *et al.*, 2008) ou água (Bono *et al.*, 2007; Viscardi *et al.*, 2008) contaminados, algumas vezes com número de células muito baixo - de uma a dez células no caso de *E. coli* O157:H7 (Schmid-Hempel e Frank, 2007).

Os principais alimentos envolvidos na transmissão deste patógeno são carnes mal cozidas, leites não pasteurizados e derivados e vegetais contaminados (Kaper *et al.*, 2004; Auvray *et al.*, 2008).

O cozimento completo de carnes e a pasteurização de leite e seus derivados são medidas de proteção importantes, mas não suficientes por si mesmas, uma vez que a contaminação pode ocorrer após esses procedimentos (Wu *et al.*, 2008).

O período médio de incubação de STEC é de três a quatro dias. As manifestações clínicas iniciam-se com diarreia não sanguinolenta, que pode ser precedida por dores abdominais com cólicas e febre de curta duração em muitos pacientes. Dentro de um ou dois dias, a diarreia se torna sanguinolenta e as dores abdominais aumentam. Esse estágio dura em média de quatro a dez dias. Na maioria dos casos a diarreia sanguinolenta será resolvida sem causar sequelas, mas em cerca de 10% dos pacientes (a maioria menores de dez anos ou idosos) a doença irá progredir para SHU (Nataro e Kaper, 1998).

A SHU é caracterizada por uma tríade: anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal. As manifestações clínicas iniciais incluem oligúria ou anúria, edema, palidez e, em alguns casos, convulsões. Com o tratamento suporte, muitos pacientes se recuperam, mas, de 3 a 5% das crianças afetadas vão a óbito e de 12 a 30% apresentam sequelas como falência renal, hipertensão ou manifestações no sistema nervoso central (Nataro e Kaper, 1998).

O tratamento de infecções causadas por STEC tem três objetivos principais: limitar a severidade e/ou duração dos sintomas gastrointestinais, evitar complicações como a SHU e evitar a disseminação da infecção para outros indivíduos (Paton e Paton, 1998).

O tratamento adequado compreende a reposição de água e sais minerais – tratamento suporte –, de modo a manter o equilíbrio eletrolítico do hospedeiro. Quando a SHU está estabelecida, podem ser necessárias medidas visando à manutenção da homeostase do organismo, como diálise e controle de hipertensão (Paton e Paton, 1998).

Embora a toxina de Shiga apresente ação extracelular, grande parte dela permanece aderida à superfície da célula bacteriana. Dessa forma, não é

recomendado o uso de antibióticos, uma vez que eles causam lise da célula bacteriana e podem aumentar os níveis de toxina liberados no lúmen intestinal, agravando o quadro clínico do paciente (Paton e Paton, 1998).

1.4 Patogenicidade de STEC

A patogênese da infecção causada por STEC em humanos depende de fatores de virulência da cepa e de características do hospedeiro (Kawano *et al.*, 2008). No início do processo, as STEC necessitam vencer os mecanismos de defesa do organismo hospedeiro e se estabelecer no intestino. Nesse sentido, é interessante o fato de STEC apresentar resistência a ambientes ácidos, uma vez que tais micro-organismos conseguem atravessar o estômago e sobreviver à sua acidez (Mathusa *et al.*, 2010).

A patogenicidade de STEC é mediada principalmente por genes – *stx*₁ e *stx*₂ - que codificam citotoxinas, que são potentes inibidores da síntese protéica e são chamadas de toxinas de Shiga (Stx₁, Stx₂ e suas variantes) e por genes presentes na ilha de patogenicidade do *locus of enterocyte effacement* (LEE), de 35kb (Paton e Paton, 1998; Law, 2000).

Assim como as EPEC, algumas cepas de STEC produzem uma lesão chamada *attaching and effacing* (A/E), que é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e pela íntima fixação da bactéria à membrana epitelial do hospedeiro através de “pedestais” de agrupamentos protéicos densos (actina polarizada) e outros elementos do citoesqueleto que se protraem da membrana apical (Donnenberg *et al.*, 1997; Frankel *et al.*, 2001).

O desenvolvimento da lesão A/E requer diversos fatores de virulência localizados na ilha de patogenicidade LEE (Paton e Paton, 1998; Frankel *et al.*, 2001). As lesões A/E são mediadas pela intimina, uma proteína de 94 kDa, codificada pelo gene *eae*, responsável pela firme aderência entre a bactéria e as membranas dos enterócitos (Donnenberg *et al.*, 1997).

Além da intimina, a ilha de patogenicidade LEE também codifica um complexo de proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e efetoras (EspF, EspG, EspH, EspZ e Map) , assim como Tir, o receptor de intimina. Estas proteínas e o receptor Tir fazem parte do sistema de secreção tipo III (Frankel *et al.*, 2001; Cornick *et al.*, 2002).

Após o íntimo contato entre as STEC e as células intestinais, as toxinas Stx₁ e Stx₂ são produzidas no intestino grosso e translocadas através do epitélio intestinal para a circulação sanguínea. São compostas de uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade A é dividida nos fragmentos A1 – fração enzimática da toxina - e A2. O fragmento A2 é responsável pela ligação da subunidade A ao pentâmero de subunidades B. O pentâmero B liga a toxina a um receptor globotriaosilceramida (Gb₃), presente na membrana de células eucarióticas. Gb₃ é o principal receptor para Stx, mas a variante Stx_{2e} utiliza o receptor Gb₄. Após a ligação ao receptor, a toxina é endocitada e transportada para o complexo de Golgi e posteriormente para o retículo endoplasmático. Nesse momento, a subunidade A é translocada para o citoplasma e atua sobre a fração 60S dos ribossomos dos enterócitos. Especificamente, a subunidade A1 é uma N-glicosidase que remove um resíduo de adenina da fração 28S do RNA ribossômico, bloqueando dessa forma a síntese protéica. A inibição da síntese protéica leva à necrose ou apoptose das células endoteliais vasculares (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

A infecção por STEC é localizada e não causa septicemia; entretanto, a toxina produzida é absorvida pelas células intestinais e por isso causa os efeitos sistêmicos da doença (Gyles, 2006). Acredita-se que a translocação da toxina para a corrente sanguínea seja auxiliada pelos danos causados ao epitélio intestinal por parte do lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria ou pela própria toxina (Nataro e Kaper, 1998).

Outro fator de virulência de STEC é a produção de entero-hemolisina (Ehx), uma hemolisina da família de toxinas citolíticas codificada por um gene localizado em um plasmídeo de 60 MDa (pO157) (Saitoh *et al.*, 2008). A entero-hemolisina lisa as hemácias do hospedeiro, liberando o elemento ferro para o uso das bactérias. Ehx

está associada a isolados provenientes de doenças humanas, como CH e SHU (Guth, 2008).

1.5 Carne e STEC

A composição da carne é complexa e oferece um meio ideal para a multiplicação microbiana (Hugas *et al.*, 2002). As carnes *in natura* apresentam atividade de água de 0,99 e pH que varia de 5,4 a 5,6. Além disso, são ricas em proteínas, apresentam baixa concentração de carboidratos e quantidade variável de lipídeo, de acordo com o corte e com o animal em questão (Franco e Landgraf, 1996).

O músculo do animal sadio é estéril. Durante o processo de abate pode ocorrer a contaminação da carne por micro-organismos, que podem estar presentes no intestino e no couro do animal, no ambiente e nas mãos dos manipuladores, sendo que num frigorífico há diferentes pontos de contaminação, que variam de acordo com a sua planta (Etcheverría *et al.*, 2010).

A contaminação de carnes pode ocorrer ainda em etapas posteriores ao abate, durante o processamento, transporte, armazenamento ou pela contaminação cruzada com micro-organismos encontrados no ambiente, superfícies, utensílios e equipamentos (Skandamis *et al.*, 2009).

O couro e as fezes de animais portadores de STEC são potenciais fontes destes micro-organismos e são de grande importância numa posterior contaminação da carne durante o processo de abate do animal, tendo como pontos críticos a retirada do couro e a evisceração (Etcheverría *et al.*, 2010).

Quanto maior a manipulação da carne, maior a probabilidade de uma possível contaminação microbiana, ou seja, em ordem crescente de probabilidade de contaminação tem-se: a carcaça do animal, os cortes para o atacado, os cortes para o varejo, as carnes picadas e as carnes moídas. Estas apresentam maior risco, uma vez que podem ser contaminadas durante o processo de moagem (Etcheverría *et al.*, 2010).

Existe pouca informação acerca de equipamentos como veículos de contaminação de STEC em alimentos (Moretro *et al.*, 2010), mas sabe-se que o processo de moagem contribui para a contaminação cruzada, como resultado do contato e da mistura de múltiplos cortes de carne (Çadirci *et al.*, 2010). Além disso, a carne moída – quando comparada a cortes de carne – apresenta maior área superficial e possibilita a homogeneização de um possível patógeno, otimizando as chances de detecção do mesmo.

A limpeza e o uso de sanificantes adequados em equipamentos e utensílios utilizados na manipulação de carnes contribuem para a redução da taxa de sobrevivência de STEC; entretanto, as superfícies desses equipamentos e utensílios devem estar bem secas, pois a umidade promove a sobrevivência e até a multiplicação destes organismos (Moretro *et al.*, 2010).

Fatores extrínsecos à carne, como a temperatura e a umidade relativa do ambiente podem promover ou dificultar a multiplicação microbiana. Sabe-se que cepas de STEC são mais resistentes à dessecação do que cepas não-STEC, como *Staphylococcus simulans* e *Salmonella Agona* (Moretro *et al.*, 2010).

Diante deste panorama, o Brasil como grande produtor, exportador e consumidor de carne bovina deve se preocupar e zelar pela inocuidade de seus produtos.

Quanto à produção mundial de carne bovina, os EUA lideraram a lista dos produtores - entre os anos 2005 e 2010 – sendo seguido por Brasil, União Européia, China e Índia (Tabela 1). No mesmo período, o Brasil liderou a lista de exportadores mundiais de carne bovina, seguido por Austrália, Índia, Nova Zelândia e Canadá (Tabela 2). Ainda entre 2005 e 2010, constatou-se que os maiores consumidores de carne bovina foram respectivamente União Européia, Brasil, China, Argentina e Índia (Tabela 3) (ABIEC, 2011).

Tabela 1. Produção mundial de carne bovina (em toneladas).

PAÍS	ANO					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Estados Unidos	11.318	11.980	12.097	12.163	11.891	12.048
Brasil	8.776	9.053	9.297	9.000	9.180	9.486
União Européia	8.090	8.150	8.188	8.090	7.913	8.085
China	5.681	5.767	6.134	6.132	5.764	5.600
Índia	2.170	2.375	2.413	2.552	2.514	2.830
Austrália	2.102	2.183	2.172	2.159	2.129	2.087
México	1.725	1.550	1.600	1.667	1.700	1.751
Canadá	1.470	1.329	1.278	1.288	1.252	1.272
Rússia	1.520	1.450	1.430	1.490	1.460	1.435
Paquistão	1.004	1.300	1.344	1.388	1.457	1.486
Outros	12.324	12.614	12.665	12.671	12.096	11.243
TOTAL	56.180	57.751	58.618	58.600	57.356	57.323

Fonte: ABIEC

Tabela 2. Exportação mundial de carne bovina (em toneladas).

PAÍS	ANO					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Brasil	2.134	2.405	2.534	2.163	1.926	1.731
Austrália	1.388	1.430	1.400	1.407	1.364	1.368
Índia	617	681	678	672	609	900
Nova Zelândia	577	530	496	533	514	530
Canadá	596	477	457	494	480	523
Argentina	754	552	534	423	655	298
Uruguai	417	460	385	361	376	347
Paraguai	193	240	206	233	254	296
União Européia	253	218	140	204	148	336
Nicaragua	59	68	83	89	101	118
Estados Unidos	326	441	657	911	895	1.162
TOTAL	7.314	7.502	7.570	7.490	7.322	7.609

Fonte: ABIEC

Tabela 3. Consumo mundial de carne bovina (em toneladas).

PAÍS	ANO					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Estados Unidos	12.664	12.833	12.830	12.452	12.239	12.040
União Européia	8.550	8.649	8.690	8.352	8.262	8.185
Brasil	7.832	8.033	7.830	6.945	6.811	7.321
China	5.614	5.692	6.065	6.080	5.749	5.589
Argentina	2.451	2.553	2.771	2.731	2.727	2.305
Rússia	2.487	2.381	2.452	2.616	2.347	2.307
México	2.028	1.894	1.961	2.033	1.971	1.944
Índia	1.553	1.694	1.735	1.880	1.905	1.930
Paquistão	1.008	1.333	1.363	1.394	1.461	1.491
Japão	1.188	1.159	1.182	1.173	1.211	1.224
Canadá	1.026	1.023	1.068	1.036	1.016	999
Outros	9.345	9.750	10.186	11.283	10.969	11.209
TOTAL	55.746	56.994	58.133	57.975	56.668	56.544

Fonte: ABIEC

Sendo assim, diante da relevância da carne bovina para a economia brasileira, do fato de não haver dados sobre a presença de STEC em carne moída adquirida no mercado consumidor da cidade de São Paulo e tendo em vista a extensão desse mercado e os diferentes tipos de estabelecimentos existentes nessa cidade, este estudo visou a geração de dados para avaliar a presença desse grupo de micro-organismos em amostras de carne moída adquiridas na cidade de São Paulo, considerando, ainda, a sua importância para a saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a presença de *E. coli* produtora de toxina de Shiga em carne moída bovina resfriada comercializada na cidade de São Paulo,SP e caracterizar os isolados obtidos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença dos fatores de virulência nos isolados de *E. coli* através da pesquisa dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ehx*;

- Identificar isolados de *E. coli* O157:H7 através da pesquisa dos genes *uid*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7};

- Identificar os sorotipos dos isolados de STEC;

- Evidenciar a citotoxicidade dos isolados em cultura de células Vero e a produção de enterohemolisina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo.

Todos os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid (Basingstoke, Inglaterra), exceto quando destacado no texto. O preparo de todos os meios de cultura seguiu as instruções do fabricante.

3.1 Material

3.1.1 Cepas utilizadas

Uma cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933, gentilmente cedida pela Dra. Roxane Maria F. Piazza do Instituto Butantan, São Paulo, SP, foi utilizada como controle positivo para todos os experimentos realizados. Como controle negativo foi utilizada uma cepa de *E. coli* K12, pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF – USP, São Paulo, SP.

Cepas de *E. coli* dos sorogrupos O103, O111 e O26, gentilmente cedidas pela Dra. Beatriz E. C. Guth da Unifesp, São Paulo, SP, foram utilizadas como controle positivo na etapa de isolamento dos micro-organismos.

Todas as cepas, bem como os isolados obtidos a partir das coletas realizadas, foram mantidos à temperatura de -70°C em caldo triptona soja (TSB) adicionado de 20% de glicerol (Synth).

3.1.2 Amostragem

Foram utilizadas amostras de carnes moídas bovinas resfriadas e comercializadas no varejo de diferentes regiões da cidade de São Paulo/SP, Brasil. O número total de amostras analisadas foi de 248 levando em consideração a prevalência esperada de 10% do micro-organismo nesse produto, nível de confiança de 95% e margem de erro de 5% (OIE, 2000)

A cidade de São Paulo é dividida em 31 distritos (Figura 1) distribuídos numa região central (Figura 2) e nas zonas norte (Figura 3), sul (Figura 4), leste (Figura 5) e oeste (Figura 6). Esses 31 distritos são formados por 198 bairros principais. Neste estudo, as amostras foram coletadas em 180 bairros, o que significa uma cobertura de 91% dos principais bairros da cidade.

O plano de amostragem visou a coleta de oito amostras em cada um dos distritos da cidade de São Paulo, totalizando as 248 amostras analisadas. Quando o distrito apresentava menos de oito bairros principais (segundo o sítio da Prefeitura de São Paulo), foram sorteados os bairros onde mais de uma amostra seria coletada. Quando o distrito apresentava mais de oito bairros principais, as coletas foram realizadas em oito bairros previamente sorteados.

O critério de seleção dos estabelecimentos (açougues ou mercados) onde foram adquiridas as amostras foi totalmente aleatório, ou seja, uma vez no bairro em questão, a compra da amostra foi realizada no primeiro estabelecimento encontrado.

Figura 1. Mapa da cidade de São Paulo com 31 distritos.

Fonte: Prefeitura de São Paulo

(<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/>)

Figura 2. Mapa da região central da cidade de São Paulo.
 Fonte: Encontra SP (<http://www.centrodesp.com.br/>)

Figura 3. Mapa da zona norte da cidade de São Paulo
 Fonte: Encontra SP (<http://www.zonanortesp.com.br/>)

Figura 4. Mapa da zona sul da cidade de São Paulo.
 Fonte: Encontra SP (<http://www.zonasulsp.com.br/>)

Figura 5. Mapa da zona leste da cidade de São Paulo.

Fonte: Encontra SP (<http://www.zonalestedesp.com.br/>)

Figura 6. Mapa da zona oeste da cidade de São Paulo.

Fonte: Encontra SP (<http://www.zonaouestesp.com.br/>)

3.1.3 Coleta das amostras

Foram coletadas 248 amostras dos seguintes distritos da cidade de São Paulo:

- Zona norte: Anhanguera, Pirituba, Freguesia do Ó, Casa Verde, Santana, Tremembé e Vila Maria (Tabela 4);
- Zona sul: Parelheiros, Socorro, M'Boi Mirim, Campo Limpo, Santo Amaro, Cidade Ademar, Jabaquara, Ipiranga e Vila Mariana (Tabela 5);
- Zona leste: Mooca, Vila Prudente, Aricanduva, Penha, Itaquera, Ermelino Matarazzo, São Miguel, Itaim, Guaianazes, Cidade Tiradentes e São Mateus (Tabela 6);
- Zona oeste: Butantã, Pinheiros e Lapa (Tabela 7);
- Região central: Sé (Tabela 8).

As coletas ocorreram entre os meses de julho/2010 e junho de 2011 e a massa de carne comprada variava entre 200 e 500g.

As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e foram imediatamente, transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP. O início da análise era imediato.

Tabela 4. Distritos e bairros amostrados na zona norte da cidade de São Paulo.

Distrito	Bairro	Número de Bairros no Distrito	Número de Amostras Coletadas no Distrito
Anhanguera	Perus, Jardim Britânia e Jardim Anhanguera	3	8
Pirituba	Parada de Taipas, Jaraguá, Vila Clarice, Vila Zart, Jardim Cidade Pirituba, Vila Mangalot, São Domingos, City América	8	8
Santana	Cantareira, Mandaqui*, Lauzane, Barro Branco, Tucuruvi*, Imirim, Parada Inglesa, Jardim São Paulo, Alto de Santana, Anhembi	10	8
Tremembé	Jardim Daisy, Tremembé, Horto Florestal, Guapira, Vila Gustavo, Jaçanã, Parque Edu Chaves	7	8
Freguesia do Ó	Brasilândia, Itaberaba, Moinho Velho, Piqueri	4	8
Casa Verde	Vista Alegre, Vila Nova Cachoeirinha, Jardim São Bento, Limão, Casa Verde	5	8
Vila Maria	Vila Medeiros, Vila Sabrina, Vila Guilherme, Jardim Japão, Vila Maria Alta, Parque Novo Mundo, Vila Maria Baixa	7	8
Total de Bairros/Amostras		44	56

*Bairros não amostrados.

Tabela 5. Distritos e bairros amostrados na zona sul da cidade de São Paulo.

Distrito	Bairro	Número de Bairros no Distrito	Número de Amostras Coletadas no Distrito
Parelheiros	Parelheiros, Engenho Velho, Embura	3	8
Socorro	Jurubatuba, Interlagos, Guarapiranga, Jardim Edda, Jardim Edi, Parque Cocaia, Grajaú	7	8
M'Boi Mirim	Centro Empresarial, Jardim São Luiz, Parque Independência, Jardim Ângela, Capela	5	8
Campo Limpo	Morumbi Sul, Pirajuçara, Vila das Belezas, Capão Redondo, Valo Velho	5	8
Santo Amaro	Campo Belo, Brooklin Novo, Planalto Paulista, Chácara Santo Antônio, Granja Julieta, Vila Mascote, Cupecê, Americanópolis	8	8
Cidade Ademar	Jardim Miriam, Vila Joaniza, Balneário São Francisco, Pedreira	4	8
Ipiranga	Vila Monumento, Heliópolis, Sacomã, Vila das Mercês, São João Clímaco, Cursino, Parque Bristol	7	8
Jabaquara	Água Funda, Vila Guarani, Cidade Vargas	3	8
Vila Mariana	Paraíso, Chácara Klabin, Ibirapuera, Vila Clementino, Vila Nova Conceição, Moema, Mirandópolis, Saúde	8	8
Total de Bairros/Amostras		50	72

Tabela 6. Distritos e bairros amostrados na zona leste da cidade de São Paulo.

Distrito	Bairro	Número de Bairros no Distrito	Número de Amostras Coletadas no Distrito
Mooca	Canindé, Pari*, Brás, Belenzinho, Parque São Jorge, Tatuapé, Vila Gomes Cardim*, Anália Franco, Mooca Baixa, Alto da Mooca*, Parque da Mooca, Água Rasa*	12	8
Vila Prudente	Jardim Avelino, Vila Ema, Vila Alpina, Parque São Lucas, Sapopemba	5	8
Aricanduva	Carrão, Jardim Têxtil, Vila Mafra, Vila Formosa, Vila Aricanduva	5	8
São Mateus	Cidade IV Centenário, Jardim Nove de Julho, Jardim Malibu, São Rafael, Iguatemi	5	8
Penha	Engenheiro Goulart, Jardim Danfer, Cangaíba, Penha de França*, Vila Ré*, Vila Matilde, Artur Alvim, Vila Dalila, Vila Esperança, Vila Talarico*, Vila Nhocunhé	11	8
Itaquera	Cidade A. E. Carvalho, Corinthians-Itaquera, Cidade Líder, José Bonifácio, Jardim Marabá, Parque do Carmo, Jardim Cibebe	7	8
Cidade Tiradentes	Passagem Funda, Cidade Castro Alves, Bairro dos Pereiras	3	8
Guaianazes	Jardim Gianetti, Lajeado, Cidade Popular	3	8
Itaim	Vila Curuçá, Jardim Meliunas, Itaim Paulista, Vila Silva Teles, Jardim Robrú	5	8
São Miguel	Jardim Helena, São Miguel Paulista, Vila Jacuí, Jardim da Casa Pintada	4	8
Ermelino Matarazzo	USP Leste, Vila Calorina, Ponte Rasa	3	8
Total de Bairros/Amostras		63	88

*Bairros não amostrados.

Tabela 7. Distritos e bairros amostrados na zona oeste da cidade de São Paulo.

Distrito	Bairro	Número de Bairros no Distrito	Número de Amostras Coletadas no Distrito
Pinheiros	Alto de Pinheiros, Vila Madalena, Paulista, Cerqueira César, Jardins, Itaim Bibi, Cidade Jardim, Vila Olímpia	8	8
Butantã	Cidade Universitária, Jardim Bonfiglioli, Rio Pequeno, Caxingui*, Jardim Guedala*, Morumbi, Jardim D'Abril, Educandário*, Vila Sônia, Real Parque, Paraisópolis	11	8
Lapa	Jaguara*, Jaguaré, Vila Leopoldina, City Lapa*, Vila Romana, Lapa de Baixo, Barra Funda, Água Branca, Pompéia, Perdizes*, Sumaré	11	8
Total de Bairros/Amostras		30	24

*Bairros não amostrados.

Tabela 8. Distritos e bairros amostrados na região central da cidade de São Paulo.

Distrito	Bairro	Número de Bairros no Distrito	Número de Amostras Coletadas no Distrito
Sé	Bom Retiro, Campos Elíseos*, Santa Cecília, Higienópolis, Pacaembú, Centro, Liberdade, Bixiga*, Glicério*, Cambuci, Aclimação	11	8
Total de Bairros/Amostras		11	8

*Bairros não amostrados.

3.2 Métodos

3.2.1 Pesquisa de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (ISO 16654 e *Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals* NRM 006)

Etapas de enriquecimento: 25 g de cada amostra foram adicionados a 225 mL de caldo tripticase soja (TSB) modificado acrescido de novobiocina (mTSB+N) e homogeneizados em *stomacher* (Stomacher, 400, Seward, UK) por 30 s. Posteriormente, foram incubados, em estufa, a 41,5 °C/24 h.

Etapas de Isolamento: Após o período de incubação, realizou-se a técnica de separação imunomagnética (IMS). Para isso, adicionou-se um mL do caldo de enriquecimento e 20 µL de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos anti O157, O26, O103, O111 e O145 (Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway) em microtubos de um mL e meio, individuais para cada sorogrupo pesquisado. Os microtubos foram colocados em uma estante que foi invertida várias vezes e incubada em temperatura ambiente por dez minutos com leve agitação em agitador específico (Dynal MX4 Sample Mixer, Invitrogen), garantindo a homogeneização da mistura. Transcorridos os dez minutos, uma placa magnética foi inserida na estante, permanecendo na lateral dos microtubos por três minutos. A ligação antígeno-anticorpo, captada pelo ímã, fez com que se formasse um sedimento na parede dos microtubos. O sobrenadante foi retirado, assim como a placa magnética, e o sedimento foi ressuspenso em um mL de solução tampão (Anexo A). Todo o procedimento realizado após a homogeneização por dez minutos foi realizado por mais duas vezes, sendo a última ressuspensão feita com apenas 100 µL da solução tampão (Figura 7).

Para a pesquisa do sorogrupo O157, dos 100 µL da suspensão obtida após a IMS, um µL foi semeado de maneira a obter colônias isoladas em superfície de ágar MacConkey sorbitol (SMAC), 49,5 µL foram semeados de maneira análoga à anterior em superfície de ágar MacConkey sorbitol adicionado de telurito de potássio e cefixima (SMAC-TC) e 49,5 µL foram semeados em superfície de meio de cultura CHROMagar® O157 (Invitrogen) (Figura 8).

Para a pesquisa dos demais sorogrupos, dos 100 µL da suspensão obtida após a IMS, 50 µL foram semeados de maneira a obter colônias isoladas em superfície de ágar MacConkey e os 50 µL restantes foram desprezados (Figura 9).

De três a cinco colônias típicas e atípicas de cada placa de SMAC e SMAC-TC e de três a cinco colônias típicas de CHROMagar® e ágar MacConkey foram selecionadas e mantidas à -70°C em caldo triptona soja (TSB) adicionado de 20% de glicerol (Synth).

Foram utilizadas de três a cinco colônias quando as placas apresentaram multiplicação com esse número de colônias isoladas. Quando havia menos de três colônias isoladas, foram selecionadas todas as colônias isoladas da placa.

As colônias típicas de STEC O157:H7 em SMAC, SMAC-TC e ágar MacConkey são esféricas, pequenas e transparentes. Em SMAC e SMAC-TC colônias sorbitol-positivas – atípicas - são caracteristicamente esféricas e cor-de-rosa. Em CHROMagar® as colônias típicas de STEC O157:H7 são esféricas, pequenas e violetas.

Figura 7. Representação esquemática do processo de separação imunomagnética.
(TSBm+N: caldo triptona soja modificado e adicionado de novabiocina)

Figura 8. Representação esquemática do processo de isolamento de *E. coli* O157:H7 (ISO 16654). (TSBm+N: caldo triptona soja modificado e adicionado de novobiocina; SMAC: ágar MacConkey sorbitol; CH: CHROMagar® O157; SMAC-TC: ágar MacConkey sorbitol adicionado de telurito de potássio e cefixima; TSB: caldo triptona soja; PCR: reação em cadeia da polimerase)

Figura 9. Representação esquemática do processo de isolamento de *E. coli* não-O157:H7 (NRM 006). (TSBm+N: caldo triptona soja modificado e adicionado de novabiocina; MAC: ágar MacConkey; TSB: caldo triptona soja; PCR: reação em cadeia da polimerase)

3.2.2 Pesquisa das sequências genéticas para *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehx*, *uid*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}

Preparo do DNA

Foi feito um *pool* com cinco a dez dos isolados obtidos, provenientes de diferentes meios de cultura e amostras. Os isolados foram inoculados em caldo TSB e incubados a 37 °C/24 h. Após este período, foi realizada a extração de DNA dos *pools* dos isolados, através do *kit DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Os DNAs obtidos foram quantificados utilizando o aparelho Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e utilizados nas reações de PCR numa concentração entre 70 e 100 ng/mL.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram conduzidas quatro PCR independentes, uma *multiplex* para os genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae* (Feng e Monday, 2000) e outra para a detecção das sequências genéticas de *rfb*_{O157} (Paton e Paton, 1998) e *fliC*_{H7} (Gannon *et al.*, 1997). As duas outras reações realizadas foram *simplex* e buscavam pesquisar os genes *ehx* e *uid*, segundo metodologia descrita por Feng e Monday (2000), com modificações, isto é, foram realizadas reações *simplex* para a pesquisa desses genes e não *multiplex* como consta da referência. Todas as demais condições de reação estão de acordo com a referência utilizada.

Os iniciadores utilizados estão apresentados na tabela 9. Tanto as PCR *multiplex* como as *simplex* foram realizadas empregando-se o *kit Go Taq Green Master Mix* (Promega Corporation, Madison, USA), onde a 12,5 µL do reagente do *kit* foram adicionados 300 nM de cada iniciador (IDT, USA), três µL do DNA teste e água deionizada esterilizada suficiente para um volume final de reação de 25 µL.

A amplificação para os genes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *uid* e *ehx* foi realizada através de um aquecimento inicial a 95 °C por três min, seguida de 25 ciclos de um min a 94 °C; um min a 56 °C e um min a 72 °C e uma extensão final por sete min a 72 °C. Para os genes *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}, usou-se amplificação com aquecimento inicial a 95 °C por um min seguida de 30 ciclos de 15 s a 95 °C; 15 s a 50 °C e 30 s a 72 °C e uma extensão final por oito min a 72 °C. Ambas as reações foram realizadas em termociclador Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Alemanha).

Os produtos amplificados foram mantidos a 4 °C até o momento do uso.

3.2.3 Análise do produto amplificado

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X (tampão borato EDTA – pH 8,2). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Gel XL Ultra V-2 (Labnet, EUA) contendo TBE 0,5X por 60 min a 100 V (para a reação *multiplex* para os genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae*) e por 45 min a 100 V para as demais reações.

Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 µg.mL⁻¹) (Pharmacia, USA), e a imagem foi registrada com o auxílio do sistema Doc-It®LS (UVP Life Science Software, EUA), sob transiluminação UV 320 nm.

Tabela 9: Iniciadores utilizados para a realização da PCR.

Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>stx</i> ₁	*F: cag tta atg tgg tgg cga agg **R: cac cag aça atg taa ccg ctg	348	Feng e Monday, 2000
<i>stx</i> ₂	F: atc cta ttc ccg gga gtt tac g R: gcg tca tcg tat aca cag gag c	584	Feng e Monday, 2000
<i>eae</i>	F: att acc atc cac aca gac ggt R: aca gcg tgg ttg gat caa cct	397	Feng e Monday, 2000
<i>ehx</i>	F: gtt tat tct ggg gca ggc tc R: ctt cac gtc acc ata cat at	158	Feng e Monday, 2000
<i>uid</i>	F: gcg aaa act gtg gaa ttg gg R: tga tgc tcc atc act tcc tg	252	Feng e Monday, 2000
<i>rfb</i> _{O157}	F: cgg aca tcc atg tga tat gg R: ttg cct atg tac agc taa tcc	259	Paton e Paton, 1998
<i>fliC</i> _{H7}	F: gcg ctg tcg agt tct atc gagc R: caa cgg tga ctt tat cgc cat tcc	625	Gannon <i>et al.</i> , 1997

*F: Forward; **R: Reverse

3.2.4 Identificação bioquímica

Os isolados que apresentaram a presença dos genes *stx*₁ ou *stx*₂ ou ambos (*stx*₁ + *stx*₂) foram submetidos à identificação bioquímica através dos meios EPM, MiLi e citrato de Simmons.

Após a inoculação, os meios EPM e MiLi foram incubados a 37 °C/24 h e o meio citrato de Simmons foi incubado a 37 °C/3 a 5 dias.

3.2.5 Teste de citotoxicidade em células Vero

Os isolados de *E. coli* que apresentaram as sequências *stx*₁ ou *stx*₂ ou ambas (*stx*₁ + *stx*₂) foram submetidos à pesquisa da produção de toxina de Shiga nos sobrenadantes das culturas (Gentry e Dalrymple, 1980; Karmali, 1989).

Preparo do sobrenadante das culturas de *E. coli*

As amostras de *E. coli* foram semeadas em tubos contendo caldo Luria Bertani (LB) e incubadas por 18-24 horas a 37 °C. Após esse período, três mL desta cultura foram homogeneizados e transferidos para um tubo, que foi centrifugado por 30 minutos a 1197 g em centrífuga Eppendorf Netheler – Hnz GmbH 22331 (Alemanha). Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos estéreis, filtrados em membranas esterilizantes (Milipore) de 0,22 µm de porosidade e mantidos a -20 °C até a realização do teste.

Realização do teste

Microplacas com 96 cavidades contendo cultura de células Vero em uma concentração aproximada de 150.000 células/cavidade foram adquiridas junto ao laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo, onde ocorreu a realização do teste.

O meio presente nas placas [meio D-MEM adicionado de um mM de aminoácidos não essenciais e 2% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil)] foi vertido e substituído por 100 µL do mesmo meio preparado no momento do uso. Em seguida, foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes dos isolados a serem testados, todos em duplicatas. Cada amostra de sobrenadante foi testada em uma diluição 1:4.

As placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) por 24 h, 48 h e 72 h, e a leitura realizada em microscópio invertido

(Nikon, Tóquio, Japão), através da observação da lise celular, com leituras em 24 h, 48 h e 72 h de incubação.

3.2.6 Pesquisa de atividade enterohemolítica: os isolados de STEC que apresentaram as sequências *stx*₁ e/ou *stx*₂ foram submetidos à pesquisa de atividade enterohemolítica. Para tanto, esses isolados foram inoculados em TSB e incubados a 37 °C/24 h. Posteriormente, foram semeados, por picada, em placas de *Blood Agar Base* (BAB) suplementadas com dez mM de CaCl₂ e 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado com solução fosfato salina tamponada (Anexo B), segundo Beutin *et al.* (1989). As placas foram incubadas a 37 °C e a presença da atividade hemolítica foi verificada após 3 h e 24 h de incubação. Amostras que apresentaram um halo de hemólise pequeno e turvo após 24 h de incubação foram consideradas como produtoras da enterohemolisina.

3.2.7 Determinação dos sorotipos: a identificação dos antígenos somáticos (O1 ao O181) e flagelares (H1 ao H56) foi realizada, segundo Ewing (1986) e conduzida pela Dra. Tânia Maria Ibelli Vaz do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP). Foram utilizados anti-soros preparados na Seção de Bacteriologia do mesmo Instituto, utilizando cepas de referência de *E. coli* recebidas do Centro Internacional de Referência (World Health Organization – WHO).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 248 amostras, sendo 122 classificadas como carne moída de 1ª, 109 classificadas como carne moída de 2ª e as 17 amostras restantes, que não apresentaram nenhuma especificação, eram denominadas de “moída especial” (Tabela 10). Oitenta e cinco amostras de carne de 1ª foram obtidas em açougues e o restante em mercados, 68 amostras de carne de 2ª foram adquiridas em açougues e as demais em mercados, 15 amostras de carne “moída especial” foram coletadas em açougues e duas amostras em mercado (Tabela 10).

Tabela 10. Classificação e origem das amostras de carne moída analisadas.

Amostras	Origem		Total
	Açougue	Mercado	
Carne de 1ª	85	37	122
Carne de 2ª	68	41	109
Carne “moída especial”	15	2	17
Total	168	80	248

Das amostras analisadas, 51 foram moídas no momento da compra e 197 já estavam pré-moídas no momento da compra (Tabela 11). A maior parte da carne moída no momento da compra foi classificada como carne de primeira, pois, na maioria das vezes as carnes pré-moídas nos estabelecimentos eram de segunda.

Tabela 11. Momento da moagem das amostras de carne moída analisadas.

Amostras	Momento da Moagem		Total
	No momento da compra	Carne pré-moída	
Carne de 1ª	37	85	122
Carne de 2ª	14	95	109
Carne “moída especial”	0	17	17
Total	51	197	248

A partir das 248 amostras analisadas, foram obtidos 1886 isolados que foram agrupados em *pools*, contendo de cinco a dez isolados cada, para a extração de DNA e posterior realização da PCR. Quando o *pool* apresentou resultado positivo para um ou ambos os genes *stx*₁ ou *stx*₂, a extração de DNA foi novamente realizada com os isolados individuais correspondentes ao *pool* em questão, seguida de PCR.

Dos 1886 isolados obtidos, apenas um apresentou resultado positivo para os genes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *uid*, *ehx*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}, ou seja, das 248 amostras estudadas, uma (0,4%) apresentou positividade para os genes pesquisados (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Nos testes bioquímicos esse isolado apresentou os seguintes resultados: fermentação da glicose com produção de gás, ausência da produção de H₂S, ausência das enzimas urease, triptofano desaminase e lisina descarboxilase e ausência de motilidade. Além disso, esse isolado produziu indol e não foi capaz de utilizar o citrato como fonte única de carbono. Dessa maneira, o isolado foi caracterizado como pertencente à espécie *Escherichia coli*.

Quanto à expressão genética dos genes de virulência, essa cepa apresentou alta atividade citotóxica – mais de 50% de lise celular - em células Vero de rim de macaco em 24 h de incubação. Por outro lado, não foi capaz de produzir enterohemolisina e nem α -hemolisina.

Após os testes moleculares, bioquímicos e sorológicos, esse isolado foi caracterizado como STEC O157:H7.

Esse isolado foi obtido de ágar SMAC-TC (colônia típica), proveniente de uma amostra de carne moída de segunda comprada em açougue do bairro de Vila Ema (região de Vila Prudente – zona leste da cidade de São Paulo). Quando questionado sobre a procedência desta carne, o funcionário do açougue disse que a mesma havia sido comprada de um frigorífico, mas não soube informar maiores detalhes.

O açougue em questão era de porte médio e localizado em local movimentado. O estabelecimento à época apresentava condições de higiene aparentemente

aceitáveis, sem odores fortes ou sinais visíveis de sujidades. Por outro lado, como a maioria dos açougues visitados, sobras ou retalhos de carne eram mantidos sobre o moedor de carnes, sem qualquer tipo de proteção física ou térmica. Além disso, facas, utensílios e equipamentos entravam em contato com diferentes cortes de carnes sem prévia higienização.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *fliC_{H7}* (Gannon *et al.*, 1997) e *rfb_{O157}* (Paton e Paton, 1998). M: marcador de peso molecular (100 pb); P1: *pool* positivo para *fliC_{H7}*, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8: *pools* positivos para *fliC_{H7}* e *rfb_{O157}*; P9: *pool* positivo para *rfb_{O157}*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: controle negativo da reação.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *stx₁*, *stx₂* e *eae* realizada segundo Feng e Monday (2000) com modificações. M: marcador de peso molecular (100 pb); P1 a P4 e P6 a P9: *pools* negativos para *stx₁*, *stx₂* e *eae*; P5: *pool* positivo para *stx₁*, *stx₂* e *eae*; C+1, C+2: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933 em diferentes concentrações; C-: controle negativo da reação.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *uid* realizada segundo Feng e Monday (2000) com modificações. M: marcador de peso molecular (100 pb); P1, P4, P7: *pools* positivos para *uid*; P2, P3, P5, P6: *pools* negativos para *uid*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: controle negativo da reação.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *ehx* realizada segundo Feng e Monday (2000) com modificações. M: marcador de peso molecular (100 pb); A1, A2: *pools* positivos para *ehx*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

No Brasil, apesar da ocorrência de STEC em alimentos ser extremamente baixa, há relatos da sua presença em carnes e produtos derivados (Cerqueira *et al.*, 1997; Bergamini *et al.*, 2007; Rodolpho e Marin, 2007; Alvares, 2011) e em amostras de carcaças (Rigobelo *et al.*, 2008; von Laer, 2009) e de fezes de bovinos (Cerqueira *et al.*, 1999; Rigobelo *et al.*, 2006a, b; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; von Laer, 2009).

Na cidade do Rio de Janeiro, RJ, foram analisadas 105 amostras de carnes moídas, hambúrgueres, quibes e almôndegas e, dentre a detecção de alguns patótipos de *E. coli* diarreiogênicas não foi isolado o sorotipo de STEC O157:H7. Entretanto, sorogrupos de STEC não-O157 foram isolados em 19% das amostras analisadas, destacando-se os sorotipos O46:H38, O116:H21, O82:H8, O113:H21 e NT:H21 (Cerqueira *et al.*, 1997). Ao contrário do nosso trabalho, esse estudo não utilizou a separação imunomagnética na etapa de isolamento desses micro-organismos.

Bergamini *et al.* (2007), no estado de São Paulo, por outro lado, não detectaram o sorotipo por nós isolado e nem os sorotipos isolados por Cerqueira *et al.* (1997) em pesquisa realizada com 250 amostras de carne moída coletadas em Campinas (136 amostras) e Ribeirão Preto (114 amostras). Foram isolados os sorotipos O93:H19, ONT:HNT, ONT:H7 e O174:HNT de STEC de quatro amostras (3,5%) coletadas em Ribeirão Preto. Três isolados apresentaram positividade para *stx*₂ e *ehx* e um isolado foi positivo para *stx*₁, *stx*₂ e *ehx*.

Ainda no estado de São Paulo, na cidade de Taquaritinga, entre março de 2004 a janeiro de 2005, de 287 isolados de carne moída, moedor e mão do manipulador de 23 açougues, somente quatro foram identificados como STEC (Rodolpho e Marin, 2007). Esses quatro isolados, dois provenientes de carne moída e dois do moedor, apresentaram *stx*₂.

Apesar do sorotipo O157:H7 de STEC não ter sido isolado nesses estudos, ao contrário do observado em nosso trabalho, os sorotipos isolados apresentaram genes relacionados com virulência, tais como *stx*₁ e *stx*₂ - reconhecidamente mais virulento do que o gene *stx*₁ – e *ehx*. Embora a expressão desses genes não tenha sido pesquisada, ela indicaria a capacidade desses isolados de causar uma infecção. Vale ressaltar, entretanto, que, apesar de sua importância e contribuição, a expressão dos genes responsáveis pela virulência, isoladamente, não garante o estabelecimento de

uma patologia. Diversos fatores como o ambiente, o estado de saúde do hospedeiro, entre outros, contribuem para o cenário patológico.

O trabalho de Rodolpho e Marin (2007) também demonstra que o moedor de carnes pode ser uma fonte potencial de contaminação cruzada para as diversas amostras que por ele passarem. Os micro-organismos podem formar biofilmes no moedor e em outros equipamentos e utensílios como facas e, conforme as amostras de carne entram em contato com essas superfícies, células bacterianas podem se desprender e contaminar os alimentos.

Outras pesquisas realizadas em nosso país não tiveram sucesso em isolar STEC de carne moída ou produto derivado. Podem ser citados os trabalhos realizados por Marques (1998) em São Paulo, SP, com 130 amostras de hambúrgueres, Silveira *et al.* (1999) em Campinas, SP, com 886 amostras de hambúrgueres, Costa (2010), que avaliou 552 amostras na cidade de São Paulo, SP e Silveira (2010), no Rio Grande do Sul, que testou 95 amostras de carne moída provenientes de diferentes municípios daquele estado.

O uso da separação imunomagnética na presente pesquisa provavelmente contribuiu para o isolamento do sorotipo O157:H7 o que não ocorreu nos demais trabalhos.

Na pesquisa realizada por Silveira (2010), houve a confirmação sorológica do sorogrupo O157, porém os genes relacionados à STEC não foram detectados. Tal fato não garante que os isolados não possuíam tais genes. Uma possibilidade é a perda dos genes devido, por exemplo, à maneira como os isolados foram mantidos até o momento dos testes moleculares. Dessa forma, é interessante ressaltar que todos os isolados obtidos na presente pesquisa foram imediatamente submetidos a testes moleculares para a detecção dos genes de virulência e, posteriormente, diversas cópias de cada isolado foram mantidas congeladas à temperatura de -70°C em TSB adicionado de 20% de glicerol e reativadas a cada novo teste.

Em trabalho conduzido em nosso laboratório, São Paulo, entre 2010 e 2011, Alvares (2011) não detectou STEC em 100 amostras de cortes bovinos e 100 amostras de cortes de frango adquiridas no varejo da Grande São Paulo. Como esse estudo utilizou a mesma metodologia que o nosso trabalho, podemos destacar a carne moída como um potencial veículo de STEC.

A prevalência de STEC em carnes e, especialmente em carne moída, varia muito entre diferentes países, sendo que há casos de isolamento de STEC O157 e também de STEC não-O157.

Entre novembro de 1998 e novembro de 1999, na Austrália, foram isoladas STEC em 46/285 (16%) amostras de carne moída e em 11/275 (40%) amostras de carne de carneiro (Barlow *et al.*, 2006). 95% dos isolados de carne moída apresentaram o gene *stx*₂ e 65% foram positivos para *ehx*, enquanto que os isolados provenientes de carne de carneiro apresentaram positividade de 80% para *stx*₁ e *stx*₂ e de 53% para *ehx*. Nenhum isolado apresentou o gene *eae*. Ao contrário do presente estudo, o sorotipo O157:H7 não foi detectado porém, de modo análogo ao por nós observado, não foram isolados os sorotipos O111 e O26. Os sorogrupos mais isolados foram O174 e O91 para carne moída e O128 e O91 para carne de carneiro (Barlow *et al.*, 2006).

Em Buenos Aires, entre os anos de 2001 e 2002, 50% dos isolados de 279 amostras de hambúrgueres de carne bovina e de frango e de 39 amostras de carcaça de frango apresentaram os genes *stx*₁ e *stx*₂ e 100% deles apresentaram positividade para *eae* e *ehx*. Dos isolados, 24 foram sorotipados como O157:H7 sendo 20 provenientes de 19 (6,8%) amostras de hambúrgueres e quatro isolados provenientes de quatro (10,3%) amostras de carcaça de frango.

Apesar de fazer fronteira com nosso país, o isolamento de STEC na Argentina é frequente como mostram os trabalhos de Chinen *et al.* (2001, 2009). Várias hipóteses podem explicar o isolamento de STEC na Argentina. Uma possibilidade é a

raça do gado argentino – a maioria européia – enquanto que a maior parte do rebanho bovino brasileiro é zebuino.

Outro fator é o clima: sabe-se que o gado excreta maiores concentrações de STEC nos meses mais quentes do ano. Assim, seria lógico pensar que, pelo clima do Brasil ser mais quente que o da Argentina, o país apresentasse maior prevalência desse patógeno. Como sabemos que ocorre o oposto do descrito, podemos inferir que no inverno argentino o gado receba uma alimentação diferenciada, que auxiliaria na colonização de STEC, por exemplo, causando uma alteração no pH do rúmen.

Ainda com relação ao isolamento de STEC, no Brasil há a predominância de outros patótipos de *E. coli* diarreagênicas, como as EPEC. Esse fato pode desencadear uma competição entre os grupos de micro-organismos, de modo que as STEC apresentem menor prevalência em nosso país do que na Argentina.

Trabalhos realizados na África do Sul (Abong'o e Momba, 2009) e na Turquia (Sarimehmetoglu *et al.* 2009) também mostram a presença de STEC O157:H7 em alimentos.

Entre março de 2005 e agosto de 2006, na África do Sul, foram coletadas 180 amostras de diferentes produtos cárneos tendo sido constatada a presença de STEC O157:H7 positiva para os genes *eae*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7} em cinco (2,8%) amostras (Abong'o e Momba, 2009). Apesar dos autores considerarem essa cepa como STEC, não foram pesquisados os genes para toxina de Shiga, que caracteriza o grupo.

Resultado similar ao nosso foi relatado por Sarimehmetoglu *et al.* (2009), na Turquia, que detectaram STEC O157 em duas amostras (0,79%) de carne moída adquiridas em mercados. Como o isolado por nós obtido, as cepas apresentaram os genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae*, além de *hly*. Outro fato semelhante ao nosso trabalho foi a utilização da separação imunomagnética na etapa de isolamento.

A presença de sorotipos não-O157 em carnes e derivados também já foi relatada.

Entre julho de 2005 e junho de 2007, Bosilevac e Koohmaraie (2011) conduziram um estudo nos EUA de modo a caracterizar a prevalência de STEC não-O157 em carne moída. Dentre as 4133 amostras analisadas, 300 (7,3%) apresentaram 99 diferentes sorotipos de STEC.

Estudo realizado na Turquia por Çadirci *et al.* (2010) constatou a presença do sorogrupo O157 em cinco (2,5%) das 200 amostras de carne moída (100) e almôndega (100) analisadas, porém o sorotipo O157:H7 e outros não-O157 não foram detectados. Assim como em nosso estudo, a separação imunomagnética foi utilizada. Foram obtidos oito isolados de *E. coli* O157, dos quais sete eram provenientes de almôndegas: dois apresentaram os genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae*, quatro foram positivos para *stx*₂ e *eae* e dois foram negativos para todos os genes testados. O isolado proveniente de carne moída apresentou negatividade para todos os genes pesquisados (Çadirci *et al.*, 2010).

O estudo de Çadirci *et al.* (2010) é muito semelhante ao nosso, sendo iguais os passos de enriquecimento e o emprego da separação imunomagnética. Entretanto, a etapa de isolamento apresentou diferenças. Ao contrário da presente pesquisa, onde foram utilizados três ágar para isolamento de STEC O157, os autores citados utilizaram apenas o ágar SMAC-TC, recomendado pela ISO 16654 e selecionaram somente as colônias típicas.

Além dos trabalhos citados, pesquisadores também demonstraram que a prevalência de STEC O157 ou O157:H7 em carne moída varia entre 0,1% e 54,2% (Chapmann *et al.*, 2001; Cagney *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2007).

Esses dados podem ser explicados pelo fato de serem os ruminantes a maior fonte de STEC, excretando esses micro-organismos nas fezes e, na grande maioria das vezes, não apresentando sinais de infecção. A partir das fezes, os micro-organismos podem contaminar o couro do animal. Sendo assim, o processo de retirada do couro e a evisceração são pontos críticos no momento do abate, onde há grande chance de contaminação da carcaça do animal. A presença de STEC em

carnes é o resultado de contaminação cruzada em qualquer elo desde a cadeia produtiva até mesmo na casa do consumidor. Portanto, a aplicação das boas práticas de fabricação e higiene são essenciais para a redução desses patógenos.

Os animais a serem abatidos devem estar limpos, lavados e secos, mas mesmo essa limpeza não garante a ausência de micro-organismos patogênicos (Adam e Brülisauer, 2010). Tais animais devem estar em jejum antes do abate, de modo a reduzir seu conteúdo intestinal. Além disso, no transporte dos animais, deve-se zelar para que eles estejam separados, para que se evite uma contaminação cruzada pelo couro dos animais (Adam e Brülisauer, 2010).

A variabilidade de contaminação num frigorífico depende de inúmeros fatores, tais como: a planta do abatedouro, seu desenho, idade, equipamentos, automação, velocidade do abate, localização geográfica, estação do ano, origem dos animais, entre outros (Etcheverría *et al.*, 2010).

No frigorífico, medidas de controle como a limpeza em cada passo da produção, devem ser tomadas. Entretanto, uma vez que a contaminação ocorra na planta do abatedouro, é muito difícil de controlá-la. Daí, ressalta-se a necessidade do controle desses micro-organismos ao nível da fazenda.

Saber os locais onde os animais podem abrigar micro-organismos patogênicos bem como o modo como esses micro-organismos são adquiridos é essencial para o desenvolvimento de medidas de controle.

No varejo, o risco de contaminação continua. A carne que será comercializada pode já estar contaminada ou pode vir a ser contaminada no ponto de venda ou na casa do consumidor. A contaminação nesses níveis pode ocorrer por contaminação cruzada entre as carnes e superfícies e/ou equipamentos contaminados, como facas e moedores de carnes.

Sabemos que as carnes moídas apresentam maior probabilidade de contaminação do que cortes de carne. Isso se deve à mistura de diversos retalhos de

carne e também ao processo de moagem, uma vez que o moedor pode ser um veículo de contaminação por micro-organismos, entre eles, os patogênicos.

Em nosso trabalho, o isolado de STEC O157:H7 encontrado foi proveniente de uma carne previamente moída. Entretanto, devido à baixa taxa de contaminação encontrada, não há como relacionar se o risco é maior para carnes moídas no momento da compra ou aquelas previamente moídas. O que podemos inferir é o fato de que a carne previamente moída, se foi contaminada no momento da moagem, vai se tornar um meio favorável à manutenção e multiplicação dos micro-organismos devido aos seus fatores intrínsecos e fatores extrínsecos, como abuso de temperatura.

Sabendo-se que mesmo após todas essas medidas a carne pode chegar ao consumidor contaminada com micro-organismos patogênicos, medidas como o emprego de boas práticas na manipulação e o cozimento total de carnes são de extrema importância para a saúde pública.

5. CONCLUSÃO

A partir dos dados gerados por este trabalho, podemos concluir que a ocorrência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada no varejo da cidade de São Paulo é extremamente baixa. Entretanto, devido a presença de STEC O157:H7 portadora de genes de virulência e com elevada produção da toxina de Shiga, esse alimento pode ser um risco, principalmente se ingerido cru ou mal cozido, práticas adotadas por parte da população. Daí a necessidade das boas práticas de produção e higiene da fazenda à mesa do consumidor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em 08 dez. 2011.

ABONG'O, B.O.; MOMBA, M.N.B. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from meat and meat products sold in Amathole District, Eastern Cape Province of South Africa. **Food Microbiology**, v. 26, p.173–176, 2009.

ADAM, K.; BRÜLSAUER, F. The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: A review. **International Journal of Food Protection**, v.141, p.S4-S52, 2010.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.297-306, 2007.

ALVARES, P.P. Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da Grande São Paulo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2011.

AUVRAY, F.; LECUREUIL, C.; TACHÉ, J.; PERELLE, S.; FACH, P. Development of 5'nuclease PCR assay for the identification of *Escherichia coli* strains expressing the flagellar antigen H21 and their detection in food after enrichment. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.899-905, 2008.

BARLOW, R.S.; GOBIUS, K.S.; DESMARCHELIER, P.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.1-5, 2006.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.553-556, 2007.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, I.M.A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 2559-2564, 1989.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin) –producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.311-319, 2004.

BONO, J.L.; KEEN, J.E.; CLAWSON, M.L.; DURSO, L.M.; HEATON, M.P.; LAEGREID, W.W. Association of *Escherichia coli* O157:H7 *tir* polymorphisms with human infection. **BMC Infectious Diseases**, v.7:98, p.1471-2334, 2007.

BOSILEVAC, J.M.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.2103-2112, 2011.

CAGNEY, C.; CROWLEY, H. DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J.; O'BRIEN, S.; CARNEY, E.; ANDERSON, W.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S.; BISHOP, R.H. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. **Food Microbiology**, v.21, p.203-212, 2004.

ÇADIRCI, O.; SIRIKEN, B.; INAT, G.; KEVENK, T.O. The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR. **Meat Science**, v.84, p.553-556, 2010.

CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of Shigalike toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 177-180, 1997.

CHAPMANN, P.A.; CERDAN, A.T.M.; ELLIN, M.R.A.; HARKIN, M.A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and in lamb products in South Yorkshire, UK. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.139-150, 2001.

CHINEN, I.; TANARO, J.D.; MILIWEBSKY, E.S.; LOUND, L.H.; CHILLEMI, G.M.; LEDRI, S.; BASCHKIER, A.; SCARPIN, M.; MANFREDI, E.; RIVAS, M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1346-1351, 2001.

CHINEN, I, EPSZTEYN, S. MELAMED, C.L.; AGUERRE, L.; ESPINOSA, E.M.; MOTTER, M.M.; BASCHKIER, A.; MANFREDI, E.; MILIWEBSKY, E.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.167-171, 2009.

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

COSTA, C.A.R. Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2011.

DONNEMBERG, M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends in Microbiology**, v.5(3), p.109-114, 1997.

ENCONTRA SP. Disponível em: <<http://www.centrodesp.com.br/>> Acesso em: 13 de dez. 2011.

ENCONTRA SP. Disponível em: <<http://www.zonanortes.com.br/>> Acesso em: 13 de dez. 2011.

ENCONTRA SP. Disponível em: <<http://www.zonasulsp.com.br/>> Acesso em: 13 de dez. 2011.

ENCONTRA SP. Disponível em: <<http://www.zonalestesp.com.br/>> Acesso em: 13 de dez. 2011.

ENCONTRA SP. Disponível em: <<http://www.zonaouestesp.com.br/>> Acesso em: 13 de dez. 2011.

ETCHEVERRÍA, A.I.; PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; POLIFRONI, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J.; RODRÍGUEZ, E.M.; TARABORELLI, A.L.; BALLERIO, M.; PARMA, A.E. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. **Meat Science**, v. 86, p.418-421, 2010.

EWING, W. H. **Edwards & Ewing's identification of *Enterobacteriaceae***. 4. ed. New York : Elsevier Science Publishers, 1986.

FENG, P.; MONDAY, S. R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 333–337, 2000.

FENG, P.C.H.; COUNCELL, T.; KEYS, C.; MONDAY, S.R. Virulence characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from wholesale product. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77(1), p.343-345, 2011.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu, São Paulo, 1996. p.33-81.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; TRABULSI, L.R.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G.; MATTHEWS, S. Intimin and the host cell – is it bound to end in Tir(s)? **Trends in Microbiology**, v.9, p.214-218, 2001.

FRANZOLIN, M.R.; CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* que causa infecções extra-intestinais (ExPEC - extraintestinal pathogenic *E. coli*). ELIAS-JÚNIOR, W.P.; GOMES, T.A.T. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo, 2005. p.303-309.

FREMAUX, B.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; PRINGENT-COMBARET, C.; GLEIZAL, A.; VERNZOY-ROZAND, C. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.89-99, 2007.

GANNON, V.P.J.; D'SOUZA, S.; GRAHAM, T; KING, R.K.; THAN, K.; READ, S. Use of flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 656-662, 1997.

GENTRY, M. K.; DALRYMPLE, J. M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, p. 361-366, 1980.

GERBER, A.; KARCH, H.; ALLENBERGER, F.; *et al.* Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000. In: Germany and Austria: A prospective study. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.493-500, 2002.

GOBERT, A.P.; COSTE, A.; GUZMAN, C.A.; VAREILLE, M.; HINDRÉ, T.; DE SABLET, T.; GIRARDEAU, J-P.; MARTIN, C. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. **Microbes and Infection**, v.10, p.159-165, 2008.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo, 5ª ed., 2008. p.289-293.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, p.E45-E62, 2006.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. **Meat Science**, v.62, p.359-371, 2002.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO16654:1998. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7.**

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

KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 355-356, 2005.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology. Rev.** v. 2, n. 1, p. 15-38, 1989.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.(189)3, p.556-563, 2004.

KAWANO, K.; OKADA, M.; HAGA, T.; MAEDA, K.; GOTO, Y. Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. **Europe Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.27, p.227-232, 2008.

LAW, D.;The story and evolution of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.701-709, 2000.

MARQUES, P.A.H.F. Avaliação de metodologias para o isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 produtora de verotoxina em hambúrgueres. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2011.

MATHUSA, E.C.; CHEN, Y.; ENACHE, E.; HONTZ, L. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. **Journal of Food Protection**, v.73(9), p.1721-1736, 2010.

MENG, J., DOYLE, M. P.; ZHAO, T. ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**, 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, cap. 12, p. 249-269, 2007.

MONEY, P.; KELLY, A.F.; GOULD, S.W.J.; DENHOLM-PRICE, J.; THRELFALL, E.J.; FLELDER, M.D. Cattle, weather and water: mapping *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans in England and Scotland. **Environmental Microbiology**, v.12(10), p. 2633-2644, 2010.

MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; JUSTEL, P.; ALONSO, M.P.; ECHEITA, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. **BMC Microbiology**, v.7, p.1, 2007.

MORETRO, T.; HEIR, E.; MO, K.R.; HABIMANA, O.; ABDELGANI, A.; LANGSRUD, S. Factors affecting survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.71-77, 2010.

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

NMR: SGDI. **Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals NMR 006**. *E. coli* O26, O103, O111 and O145: Isolation by immune-magnetic separation and presumptive identification.

OIE (Organização Internacional de Epizootias) – **Risk analysis methodology for the potential impact on public health of antimicrobial resistant bacteria of animal origin**, 2000. http://www.oie.int/eng/publicat/rt/2003a_r20314.htm

PATON, J.C.; PATON, A.W. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, *enterohemorrhagic E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.598-602, 1998.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology**, v.11, p.450-479, 1998.

POTTER, A.A.; KLASHINSKY, S.; LI, Y.; FREY, E.; TOWNSEND, H.; ROGAN, D.; ERICKSON, G.; HINKLEY, S.; KLOPFENSTEIN, T.; MOXLEY, R.A.; SMITH, D.R.; FINLAY, B.B. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. **Vaccine**, v.22, p.362-369, 2004.

PREFEITURA DE SÃO PAULO. Disponível em: <<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/>> Acesso em: 13 de dez. 2011.

RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.11(4), p.603-609, 2005.

RIGOBELLO, E. C.; STELLA, A. E.; ÁVILA, F. A.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p.194-198, 2006a.

RIGOBELLO, E. C. GAMEZ, H. J.; MARIN, J. M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J. A.; ÁVILA, F. A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.305-310, 2006b.

RIGOBELLO, E.C.; SANTO, E.; MARIN, J.M. Beef carcass contamination by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in an abattoir in Brazil: characterization and resistance to antimicrobial drugs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5 (6), p.811-817, 2008.

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

RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.599-602, 2007.

SAITOH, T.; IYODA, S.; YAMAMOTO, S.; LU, Y.; SHIMUTA, K.; OHNISHI, K.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrIA, a global regulator encoded within the locus of enterocyt effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.190(14), p.4822-4830, 2008.

SARIMEHMETOGLU, B.; AKSOY, M.H.; AYAZ, N.D.; AYAZ, Y.; KUPLULU, O.; KAPLAN, Y.Z. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.357-361, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17(1), p.7-15, 2011.

SCHMID-HEMPEL, P.; FRANK, S. Pathogenesis, virulence and infective dose. **PLOS Pathogens**, v.3, p.1372–1373, 2007.

SIGNORINI, M.L.; TARABLA, H.D. Interventions to reduce verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef in Argentina: A simulation study. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 94, p.36-42, 2010.

SILVEIRA, N.; SILVA, N.; CONTRERAS, C. MIYAGUSKU, L.; BACCIN, M.L.F.; KOONO, E.; BRAQUET, N.J. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 62, p.1333-1335, 1999.

SILVEIRA, J.B. Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de Mestrado. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 46p. 2010.

SKANDAMIS, P.N.; STOPFORTH, J.D.; ASHTON, L.V.; GEORNARAS, I.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. **Food Microbiology**, v.26, p.112-119, 2009.

TOZZI, A.E.; CAPRIOLI, A.; MINELLI, F. et al. Shiga toxin-producing *E. coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.106-108, 2003.

VISCARDI, M.; PERUGINI, A.G.; AURIEMMA, C.; CAPUANO, F.; MORABITO, S.; KIM, K-P.; LOESSNER, M.J.; IOVANE, G. Isolation and characterization of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, p.152-157, 2008.

von LAER, A.E. Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas carcaça dos animais abatidos. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2009.

WU, V.C.H.; QIU, X.; HSIEH, Y.H.P. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice with *Cornus* fruit (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) extract by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiology**, v.25, p.190-195, 2008.

ANEXO A

Composição da solução tampão (g.L⁻¹) – pH – 7,4

- Cloreto de sódio	0,15 M
- Fosfato de sódio	0,01 M
- Tween 20	0,05%

A solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121° C.

ANEXO B

Composição da solução fosfato salina tamponada (g.L⁻¹) – pH – 7,3

- Cloreto de sódio	8,5
- Cloreto de potássio	0,2
- Fosfato dissódico hidrogênio	1,91
- Fosfato de potássio dihidrogênio	0,38

A solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121° C.