BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

Prevalência e caracterização de *Escherichia coli* O157:H7 e outras cepas produtoras de toxina de Shiga (STEC) na linha de abate de carne bovina destinada à exportação

Verônica Simões Fogo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora
Prof[a] Dra. Mariza Landgraf

São Paulo
2009

DEDALUS - ACERVO - CQ
30100016543

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

Fogo, Verônica Simões
F655p Prevalência e caracterização de *Escherichia coli* O157:H7 e outras cepas produtoras de toxina de Shiga (STEC) na linha de abate de carne bovina destinada à exportação / Verônica Simões Fogo. -- São Paulo, 2009.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Landgraf, Mariza

1. Microbiologia dos alimentos 2. Bromatologia 3. Alimento : Segurança : Saúde pública I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.

664.07 CDD

Verônica Simões Fogo

Prevalência e caracterização de *Escherichia coli* O157:H7 e outras cepas produtoras de toxina de Shiga (STEC) na linha de abate de carne bovina destinada à exportação

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____

Prof[a] Dra. Mariza Landgraf
orientadora/presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

São Paulo, 11 de 12 de 2009

Aos meus pais, Roberto e Gislaine,
que sempre foram os maiores apoiadores
de todos os meus sonhos e planos.

Agradecimentos

À Deus, por sua bondade infinita em ter me dado saúde e forças para lutar e por permitir que eu esteja sempre cercada das pessoas que amo.

À Profª Dra. Mariza Landgraf, por sua orientação, por confiar em mim e por tudo o que me ensinou.

À Profª Dra. Maria Teresa Destro, por suas sugestões e ensinamentos.

À Profª Dra. Bernadette Dora Gombossy Melo Franco, pelo convívio e por sua ajuda.

À Dra. Carla Taddei e Profª Dra. Marina Baquerizo, pelos ensinamentos e pela prestimosa ajuda na realização do teste de citotoxicidade em células Vero.

À Dra. Irino Kinue, do Instituto Adolfo Lutz, por sua contribuição na sorotipificação das cepas.

Aos meus queridos e amados pais, que sempre acreditaram em mim e foram pacientes, porque sabem que o melhor caminho é também o mais difícil e longo. Obrigada por todo amor, preocupação, cuidados e apoio.

Ao Felipe, eterno amor e companheiro, por sua paciência, pelo interesse em me ouvir falar sobre meu trabalho (e ainda perguntar se havia dado certo algo que nem sabia o que era), por seus incentivos, por sua constante preocupação comigo e por estar ao meu lado em absolutamente todos os momentos.

Aos meus irmãos, Débora e Rodrigo, que me proporcionaram momentos de profunda alegria e, mesmo nos mais difíceis momentos, me tiraram inúmeros sorrisos.

À irmã que Deus me permitiu escolher, Débora Miranda. Não há palavras suficientes o bastante para agradecer todo o bem que sempre me fez.

Aos meus queridos amigos Aline Paternostro e Flávio Uehara, pela verdadeira amizade, incentivos, conselhos, ensinamentos e carinho ao longo de 9 anos.

Aos amigos que ganhei, Anderson, Crystina, Danielle, Graciela, Janaína, Matheus e Priscila, por toda ajuda, ensinamentos, incentivo, carinho, amizade e momentos de alegria que me proporcionaram.

À Kathelin, pela grande amizade e companhia maravilhosa durante as longas viagens para coleta e pela imensa ajuda em tantos momentos.

À Ana Eucares, por sua ajuda logo em meu primeiro dia e todas as vezes que precisei.

Aos colegas do laboratório, André, Adriana, Angela, Eb, Gabriela, Kátia, Lina, Lúcia, Marildes, Slavi, Tatiana e Vanessa, pela colaboração e ensinamentos.

À Profª Ms. Sandra Heidtmann, a quem tanto admiro, que me fez abrir os olhos para a microbiologia, me incentivou e sempre acreditou em mim.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Programa *ProSafeBeef* pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE ANEXOS x

RESUMO xi

ABSTRACT xiii

1 INTRODUÇÃO 1

Infecções por STEC 9

Mecanismos de patogenicidade 10

Marcadores de virulência 13

Associação a alimentos 14

Gado bovino como reservatório de STEC 15

Fontes de contaminação durante o abate de bovinos 17

2 OBJETIVOS 19

Gerais 19

Específicos 19

3 MATERIAIS E MÉTODOS 20

3.1 Materiais 21

3.1.1 Coleta das amostras 21

3.2 Métodos 23

3.2.1 Preparo das amostras de couro e carcaça de bovinos 23

3.2.2 Enumeração de *Escherichia coli* O157 (ISO 16654, 1998).. 23

3.2.3 Detecção de *Escherichia coli* O157 (ISO 16654, 1998) 25

3.2.4 Avaliação da sensibilidade dos métodos empregados para enumeração e isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 27

3.2.5 Pesquisa dos genes para stx_1 e stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*..... 27

3.2.5.1 Preparo do DNA..... 27

3.2.5.2 Reação de PCR 28

3.2.5.3 Visualização dos produtos amplificados 29

3.2.6 Pesquisa da atividade entero-hemolítica (Beutin *et al.*, 1989) 30

3.2.7 Avaliação da atividade citotóxica em células Vero (Gentry e Dalrymple, 1980) 30

3.2.7.1 Preparo do sobrenadante das culturas de E. coli ... 30

3.2.7.2 Teste de citotoxicidade 31

3.2.8 Teste de resistência a antibióticos (Bauer *et al.*, 1966)..... 31

3.2.9 Determinação dos sorotipos..... 32

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 33

Presença de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) 33

Pesquisa do gene *uidA* na identificação do sorotipo O157:H7 45

Pesquisa da atividade entero-hemolítica 45

Avaliação da atividade citotóxica em células Vero 46

Avaliação da resistência a antibióticos 47

E. coli enteropatogência (EPEC) sorogrupo O157 49

Recuperação de STEC por meio da enumeração e detecção utilizando o método da separação imunomagnética 50

5 CONCLUSÕES 53

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Exemplos de surtos causados por STEC entre 2000 e 2009. 07

Tabela 02 – *Primers* utilizados para detecção dos genes stx_1, stx_2, *eaeA, uidA* e *ehxA* por PCR, segundo Feng e Monday (2000). 29

Tabela 03 – Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) em amostras de couro, carcaça e meia-carcaça de bovinos em frigorífico com autorização para exportação para a União Européia. 33

Tabela 04 – Perfil genético, sorotipo e resultado do teste de citotoxicidade em células Vero das cepas de *Eschericia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas dos sete animais. 35

Tabela 05 – Perfil genético e sorotipo das cepas de *Escherichia coli* não produtora de toxina de Shiga (não-STEC) isoladas dos cinco animais. 49

Tabela 06 – Método de isolamento das cepas de STEC de acordo com animal e origem da amostra. 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Diagrama esquemático mostrando a sequência de eventos de EPEC nos enterócitos durante infecção. 04

Figura 02 – Diagrama esquemático mostrando o modo de adesão das diferentes linhagens de *Escherichia coli*. 06

Figura 03 – Fluxograma do processo de abate no frigorífico e pontos de coleta. 21

Figura 04 – Esquema da amostragem utilizando a técnica de esfregaço de superfície. 22

Figura 05 – Esquema da enumeração de *Escherichia coli* O157 de acordo com a ISO 16654 (1998). 24

Figura 06 – Esquema da detecção de *Escherichia coli* O157 de acordo com a ISO 16654 (1998). 26

Figura 07 – Detecção dos genes stx_1, stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA* por PCR segundo Feng e Monday (2000). 34

LISTA DE ANEXOS

Anexo A –	Composição da solução tampão – pH 7,4	72
Anexo B –	Composição ($g.L^{-1}$) tampão fosfato salina – pH 7,3	73
Anexo C –	Composição ($g.L^{-1}$) do caldo Penassay – pH 7,0	74
Anexo D –	Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	75

RESUMO

Escherichia coli é um microrganismo presente no trato intestinal do homem e de animais de sangue quente, fazendo parte da microbiota, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro. No entanto, algumas linhagens desse microrganismo podem ser patogênicas e causar doenças tanto ao homem como aos animais. *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC), consideradas patógenos de origem alimentar, podem causar desde diarréias brandas até severas e sanguinolentas a complicações graves, como colite hemorrágica (HC), síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP). O gado é considerado um importante reservatório deste patógeno e a contaminação de seres humanos ocorre, na maioria das vezes, através do consumo de alimentos ou água contaminados. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a ocorrência de *E. coli* O157:H7 e outras STEC em amostras de couro de animais bovinos e de suas respectivas carcaças, na etapa de pré-evisceração, e meia-carcaças, na etapa de pós-evisceração; identificar os genes que codificam para os fatores de virulência (stx_1, stx_2, *eaeA* e *ehxA*) dos isolados obtidos; evidenciar cepas de *E. coli* O157:H7 através da pesquisa do gene *uidA*; identificar os sorotipos dos isolados; verificar a citotoxicidade dos isolados de STEC em células Vero e avaliar a sensibilidade a diferentes antibióticos. De 198 animais amostrados, sete (3,5%) apresentaram cepas de STEC. Em seis (3%) destes, STEC foi detectada no couro e em um (0,5%) foi isolada de meia-carcaça, não tendo sido detectada em amostras de carcaça. As 23 cepas isoladas do couro apresentaram o perfil stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*, podendo ser consideradas *E.*

coli enterohemorrágica (EHEC), e a isolada de meia carcaça apresentou o perfil stx_2, *uidA* e *ehxA*. Das 24 cepas isoladas, 13 (54,2%) pertenciam ao sorotipo O157:H7. Além deste sorotipo, foram isoladas cepas de outros sorotipos previamente descritos e associados a doenças humanas severas no Brasil e em outros países, como O174:H21, O6:H49, ONT:H7, ONT:H8 e OR:H10. Dos sete animais com cepas positivas para stx_2 e *ehxA*, cinco (71,4%) apresentaram cepas com atividade citotóxica em células Vero e um (14,2%) apresentou cepas positivas na avaliação da produção de entero-hemolisina. Com relação ao teste com antibióticos, quatro (16,7%) das 24 cepas testadas apresentaram resistência a um ou mais antibióticos, sendo três (12,5%) a estreptomicina e uma (4,2%) a estreptomicina e ampicilina. Diante destes resultados, pode-se dizer que a produção de entero-hemolisina e a pesquisa dos genes *ehxA* e *uidA* não demonstraram ser bons marcadores na pesquisa do sorotipo O157:H7. A presença de cepa de STEC na meia-carcaça alerta para a necessidade de vigilância da presença destes microrganismos, uma vez que eles poderiam contaminar o produto final, colocando em risco a saúde do consumidor.

ABSTRACT

Escherichia coli is a microorganism present in the intestinal tract of humans and warm-blood animals, being part of the normal microbiota and harmless to the host. However, some strains are able to cause human and animal infections. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), regarded as foodborne pathogens, can cause since mild or severe and bloody diarrhea to major complications, such as hemorrhagic colitis (HC), hemolytic-uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Cattle are considered the main reservoir of this pathogen and the transmission to humans happens, most of the times, due to the consumption of contaminated food or water. The aim of the present research was to determine the prevalence of *E. coli* O157:H7 and other STEC on hide samples of beef cattle and on their corresponding carcasses, sampled prior to evisceration, and half-carcasses, sampled after evisceration; identity the genes that code for the virulence factors (stx_1, stx_2, *eaeA* e *ehxA*) of the isolates; detect *E. coli* O157:H7 strains using the gene *uidA* as epidemiological marker; identify the serotypes of the STEC isolates; verify the citotoxicity of the isolates in Vero cells and evaluate their resistance to different antibiotics. From 198 animals sampled, seven (3.5%) carried STEC strains. In six (3%) of them, STEC was detected on hide and in one (0.5%) it was isolated from half-carcass. The 23 strains isolated from hide presented the profile stx_2, *eaeA, uidA* e *ehxA*, and were regarded as enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), and the one isolated from half-carcass presented the profile stx_2, *uidA* e *ehxA*. From the 24 isolated strains, 13 (54.2%) belonged to the serotype O157:H7. Besides this serotype, other strains belonging to

serotypes that have been previously described and associated with severe human infections in Brazil and other countries, such as O174:H21, O6:H49, ONT:H7, ONT:H8 and OR:H10, were isolated. From seven animals with strains harboring *stx_2* and *ehxA*, five (71.4%) presented verocytotoxigenic strains and one (14.2%) presented enterohemolisin producing strains. Regarding the antibiotics tested, four (16.7%) of the 24 isolated strains were resistant to some antibiotic, being three (12.5%) to streptomycin and one (4.2%) to streptomycin and ampicilin. Faced with these results, the production of enterohemolisin and the search of the genes *ehxA* and *uidA* can not be considered good epidemiological markers for the serotype O157:H7. The isolation of STEC strain from the half-carcass alerts for the need of surveillance on the presence of these microorganisms, since they may contaminate the final product, representing a risk to consumers health.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os produtos agropecuários que fazem parte da pauta de exportação do Brasil, a carne bovina ocupa lugar de destaque. Em 2004, o país se tornou o primeiro do mundo em volume de exportação de carne bovina, alcançando mais de 140 mercados. Entre janeiro e dezembro de 2008, as exportações atingiram 2,1 milhões de toneladas em equivalente carcaça, e uma produção de 9,2 milhões de toneladas, incluindo carne *in natura*, industrializada e miúdos. Além disso, essa carne é, juntamente com a de frango, uma das mais consumidas no país, com seu consumo atingindo 36,6 kg/ano *per capita* (ABIEC, 2009).

Assim, a pesquisa de patógenos na carne bovina é importante, não só naquela destinada ao mercado interno como também na destinada ao comércio internacional. Entre os patógenos veiculados por carne bovina e produtos derivados, *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga encontra-se entre os mais importantes, devido aos inúmeros surtos e casos relatados nos esteve envolvida (Rangel *et al.,* 2005; CDC, 2009).

E. coli foi primeiramente descrita em 1885 como uma bactéria componente da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis por Theodor Escherich, pediatra alemão, em uma série de estudos pioneiros da microbiota intestinal de crianças, denominando-a *Bacterium coli commune.* Somente em 1945, entretanto, essa bactéria foi definitivamente associada à diarréia infantil por John Bray, também pediatra, e a atual nomenclatura foi oficialmente aceita

em 1958, em homenagem ao seu descobridor (Kuhnert *et al.*, 2000; Kaper, 2005).

E. coli pertence à família Enterobacteriaceae, constituída por aproximadamente 30 gêneros e mais de 100 espécies. É um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos e possui uma proporção de G + C de 50 a 51%. É oxidase-negativa, capaz de reduzir nitrato a nitrito, fermentar glicose e metabolizar uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas e aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. *E. coli* possui de 1,1 - 1,5 µm x 2,0 - 6,0 µm e pode ocorrer isoladamente ou em pares. É um microrganismo anaeróbio facultativo e desenvolve-se melhor a 37°C (Holt *et al.*, 1994). *E. coli* pode apresentar motilidade por meio de flagelos ou ser imóvel (H-). Atualmente, existem 174 antígenos O para *E. coli*, numerados de 1 à 181, com exceção dos números 31, 47, 67, 72, 93, 94 e 122, 53 antígenos H (H1-H53) e 80 antígenos K (K1-K80) (Bhunia, 2008).

Predominante na microbiota intestinal anaeróbia facultativa de animais de sangue quente, *E. coli* está presente no trato intestinal de animais saudáveis, inclusive o homem, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro e desempenhando um importante papel em manter a fisiologia intestinal. No entanto, algumas linhagens desse microrganismo podem ser patogênicas e causar doenças ao homem e também aos animais (Doyle e Padhye, 1989; Meng *et al.*, 2007).

Por ter como habitat o trato intestinal, uma vez detectada no alimento *E. coli* indica uma contaminação de origem fecal e, consequentemente, condições de higiene insatisfatórias. Além disso, esse microrganismo tem grande importância em alimentos porque diversas linhagens patogênicas ao homem já estiveram envolvidas, nos últimos anos, em surtos de grandes proporções, causados principalmente por produtos cárneos (Meng *et al.*, 2007).

A patogenicidade de *E. coli* é determinada por fatores de virulência, incluindo adesinas e toxinas, codificados por genes localizados no cromossomo (ilhas de patogenicidade) ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, bacteriófagos e transposons. Desta forma, esses genes podem ser transmitidos horizontalmente entre as cepas resultando em novas combinações de genes de virulência, que estão constantemente emergindo (Kuhnert *et al.*, 2000).

Com base nos fatores de virulência, mecanismos de ação, manifestações clínicas e epidemiologia, as linhagens de *E. coli* intestinais consideradas patogênicas são, atualmente, agrupadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC - *Enteropathogenic E. coli*), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC - *Enterotoxigenic E. coli*), *E. coli* de adesão difusa (DAEC - *Diffusely Adherent E.coli*), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC – *Shiga toxin-producing E. coli*), *E. coli* enteroinvasora (EIEC - *Enteroinvasive E. coli*) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC - *Enteroaggregative E. coli*) (Nataro e Kaper, 1998).

EPEC foi a primeira linhagem de *E. coli* descrita e está primariamente associada à diarréia infantil em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004). Os sintomas podem ser severos, como diarréia aquosa, vômito e febre. EPEC coloniza o intestino delgado onde se adere fortemente ao epitélio celular das microvilosidades causando lesões histopatológicas denominadas *attaching and effacing* (AE) (Nataro e Kaper, 1998). A interação com o epitélio do hospedeiro ocorre em quatro etapas, iniciando pela expressão de fatores de aderência, seguida pela aderência inicial localizada, sinal de transdução e contato íntimo e, por fim, rearranjo do citoesqueleto com a formação de um pedestal, conforme ilustrado na Figuras 01. EPEC se adere ao epitélio celular usando a fímbria Bfp (bundle-forming pili), a intimina e EspA, e o sistema de secreção tipo III (TTSS) injeta diversas moléculas efetoras (EspB, EspD, EspG, EspF e EspH) diretamente na célula do hospedeiro. Essas moléculas ativam uma sinalização celular, permitindo a polimerização e despolimerização da actina para alterar a estrutura do citoesqueleto. O receptor Tir para intimina é, então, fosforilado por proteínas quinases e inserido na membrana da célula do hospedeiro para facilitar a ligação com a intimina da bactéria. As microvilosidades gradualmente desaparecem e perdem a capacidade de absorver nutrientes (Bhunia, 2008). EPEC normalmente não invade a mucosa intestinal, não produz toxinas e os mecanismos responsáveis pela diarréia causada ainda não foram totalmente elucidados. O número de sorogrupos pertencentes à EPEC é limitado, incluindo principalmente O14, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O147 (Nataro e Kaper, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000).

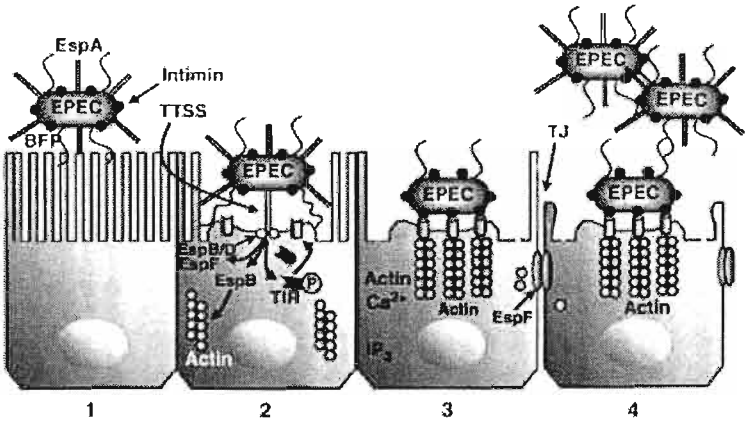

Figura 01 – Diagrama esquemático mostrando a sequência de eventos de EPEC nos enterócitos durante infecção. (1) Expressão dos fatores de aderência; (2) Aderência localizada inicial; (3) Sinal de transdução e contato íntimo; (4) Rearranjo do citoesqueleto com a formação de um pedestal (Bhunia, 2008).

ETEC é a maior causa de diarréia em crianças de países em desenvolvimento e também em adultos que viajam para esses países (diarréia do viajante). Após sua ingestão, ETEC se adere à mucosa por fatores de colonização fimbriais (CFA/I e CFA/II) e produz enterotoxinas termolábeis ou termoestáveis, colonizando o intestino delgado normalmente sem causar inflamação ou mudança histológica na parede intestinal, mas causando disfunção de eletrólitos e no transporte hídrico, levando à diarréia aquosa, febre baixa, vômito, cólicas e náusea, sintomas similares à cólera, porém mais brandos (Figura 02). Em animais, ETEC acomete recém-nascidos, como suínos, ovinos e bovinos. Os sorogrupos mais comuns são O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 e O173 (Nataro e Kaper, 1998).

EIEC é um importante agente causador de diarréia no homem e está estreitamente relacionada à *Shigella*, tendo como fatores de virulência proteínas de invasão contidas no plasmídeo pInv. EIEC interage preferencialmente com a mucosa do cólon, onde invade e se multiplica nas células epiteliais, projetando-se para as células adjacentes (Figura 02) (Bhunia, 2008). A doença é acompanhada de febre, mal-estar, cólicas abdominais e diarréia aquosa seguida de disenteria consistindo de poucas fezes, muco e sangue. Com exceção do sorotipo O124:H30, EIEC são, em sua maioria,

imóveis. O homem é o maior reservatório desses patógenos (Nataro e Kaper, 1998) e os sorogrupos mais frequentemente associados à doença são O28, O29, O112, O121, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O164, O167, O173 (Bhunia, 2008).

DAEC está associada à diarréia branda e não sanguinolenta em crianças entre um e cinco anos e é definida por um padrão de aderência difusa às células HEp-2 ou HeLa, sem que ocorra invasão ou produção de toxinas, no entanto sua patogenicidade ainda não é bem compreendida (Figura 02). Os sorogrupos mais comuns são O1, O2, O21 e O75 (Nataro e Kaper, 1998; Bhunia, 2008).

EAEC é responsável por diarréia persistente, com duração de mais de 14 dias, em crianças e adultos, tendo prevalência em países em desenvolvimento. A persistência da diarréia em crianças é similar à causada por ETEC, causando danos leves, porém significantes, na mucosa. EAEC pode se apresentar de forma difusamente aderente em células HEp-2, indicando que a adesão pode estar organizada como tijolos em uma parede (Figura 02). Os sorogrupos associados a EAEC incluem O3, O15, O44, O77, O86, O92, O111 e O127 (Nataro e Kaper, 1998; Bhunia, 2008).

STEC tem como característica principal a produção de toxinas denominadas toxinas de Shiga (Stx). Porém, assim como EPEC, alguns sorotipos de STEC são capazes de causar lesões do tipo AE (Figura 02). Esses sorotipos foram denominados EHEC, ou *E. coli* entero-hemorrágicas (Kaper *et al.*, 2004). Em humanos, STEC é responsável por um amplo espectro de doenças que varia desde diarréias brandas até severas e sanguinolentas evoluindo para complicações graves como colite hemorrágica (CH), síndrome urêmica hemolítica (SHU) e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT) (Nataro e Kaper, 1998). Outras complicações como apendicite e cistite hemorrágica podem ser observadas. Em animais, é encontrada no intestino de uma grande variedade de espécies domésticas e selvagens. No entanto, os ruminantes, em especial os bovinos e ovinos, são considerados seus principais reservatórios naturais. Alguns sorotipos de STEC, contudo, podem causar doença em animais, tais como a diarréia em bezerros e a doença do edema em suínos (Guth, 2008).

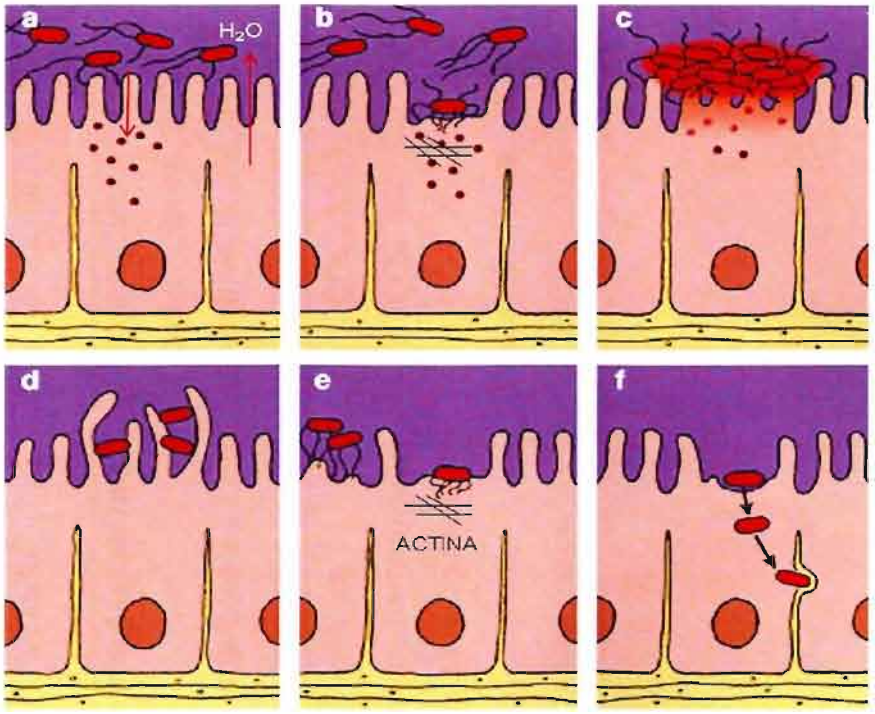

Figura 02 – Diagrama esquemático mostrando o modo de adesão das diferentes linhagens de *Escherichia coli*. (a) ETEC; (b) STEC; (c) EAEC; (d) DAEC; (e) EPEC; (f) EIEC (American Scientist, 2009).

O sorotipo O157:H7, primeiro a ser descrito nesta categoria patogênica de *E. coli*, é considerado o protótipo do grupo, além de ser o mais associado a CH e SHU na América do Norte, no Reino Unido e no Japão. No entanto, dentre os mais de 200 sorotipos de STEC atualmente conhecidos, outros são responsáveis por infecções comparáveis àquelas causadas por *E. coli* O157:H7. Sorotipos não-O157 são mais comuns na Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil, onde têm sido igualmente associados a casos de diarréia, CH e SHU. Entre os sorogrupos não-O157 mais frequentemente associados à doença humana, destacam-se O26, O103, O111, O113 e O145 (Guth, 2008).

STEC tem sido a causa de muitos surtos no mundo todo, como apresentado na Tabela 01.

Tabela 01 – Exemplos de surtos causados por STEC entre 2000 e 2009.

Ano	Localização	N° de casos (mortes)	Casos de SHU	Veículo	Referência
2000	Inglaterra	4	-	leite não pasteurizado	Eurosurveillance, 2009
2003/2004	Dinamarca	25	-	leite	Eurosurveillance, 2009
2005	Irlanda	18	-	interpessoal	Eurosurveillance, 2009
2006	EUA (26 estados)	199 (3)	31	espinafre	CDC, 2009
2006	EUA (5 estados)	71	8	alface	CDC, 2009
2007	EUA (8 estados)	40	2	carne de hambúrguer	CDC, 2009
2007	EUA (10 estados)	21	4	pizza congelada	CDC, 2009
2007	Dinamarca	20	-	salsicha	Eurosurveillance, 2009
2009	EUA (9 estados)	23	-	carne moída	CDC, 2009

Nos Estados Unidos, *E. coli* O157:H7 é considerada a principal causa de CH e SHU em crianças (Echeverry *et al.*, 2006). De acordo com estimativa de 1999 realizada pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention), aproximadamente 73.000 casos de infecção e 61 mortes são anualmente atribuídos a esse patógeno (CDC, 2007).

Entre estes surtos, o ocorrido no Japão foi o maior já relatado, envolvendo aproximadamente 10.000 casos entre os meses de maio e dezembro de 1996 (Watanabe *et al.*, 1999). Nesse mesmo ano, 21 idosos morreram em outro grande surto envolvendo 501 casos na Escócia. Dos inúmeros surtos documentados, a maioria foi atribuído ou relacionado a alimentos derivados de carne (CDC, 2009).

Apesar da maioria dos casos esporádicos e surtos terem sido relatados em países desenvolvidos, infecções humanas associadas a cepas de STEC têm sido também descritas nos países da América Latina, incluindo Argentina e Chile (Paton e Paton, 1998).

Na Argentina, onde SHU é endêmica, a porcentagem de incidência anual em crianças é estimada em 9,2 para cada 100.000 (Balagué *et al.*, 2006), constituindo a primeira causa de insuficiência renal aguda em crianças e a segunda causa de insuficiência renal crônica. Também é responsável por 20% dos casos de transplante de rim em crianças e adolescentes (Bentancor *et al.*, 2007).

No Brasil, poucos são os relatos de doença humana por STEC, contrastando com a vizinha Argentina. Até 2002, infecções por STEC se restringiam a casos esporádicos de diarréia não sanguinolenta causada por cepas não-O157 (Cantarelli *et al.*, 2000). Nesse ano, foi relatado o primeiro caso de SHU causada por STEC em um paciente de oito meses, do nordeste do Brasil. A cepa isolada é do sorotipo O26:H11 (Guth *et al.*, 2002a).

Em relação ao sorotipo O157:H7, Irino *et al.* (2002) relataram, pela primeira vez, a sua associação com doença em humanos ao analisarem cepas provenientes de três pacientes com diarréia severa à sanguinolenta no estado de São Paulo. As três cepas isoladas apresentaram os genes stx_2, *eae* e *ehx*.

Apesar da alta frequência de cepas de STEC isoladas de alimentos e de animais, apenas alguns sorotipos são reconhecidos como causadores de

doenças humanas, entre eles O157:H7, O22:H16, O26, O82:H8, O91, O103, O111, O113 e NT:H21 (Guth *et al.*, 2002a; Guth *et al.*, 2002b).

Infecções por STEC

Estudos de surtos e de casos esporádicos de STEC, causados principalmente por *E. coli* O157:H7, permitiram identificar as características das infecções. No passado, CH, SHU e PTT eram consideradas doenças isoladas. Agora, sabe-se que tais doenças estão associadas à manifestação de STEC. Algumas pessoas, no entanto, podem ser infectadas e não apresentaram sintomatologia (Karmali, 1989).

A ingestão do patógeno é seguida de um período de incubação de três a quatro dias, podendo chegar até 12 dias, durante o qual ocorre a colonização do intestino grosso (Meng *et al.*, 2007). A doença tem início com diarréia branda e fortes dores abdominais por um ou dois dias, progredindo para CH, caracterizada clinicamente por dores abdominais severas e diarréia sanguinolenta que pode durar de quatro a 10 dias. A quantidade de sangue nas fezes e ausência de febre são manifestações clinicas que diferenciam STEC de outros agentes invasores (Karmali, 1989).

Estudos epidemiológicos de surtos revelaram que mais de 90% dos casos documentados de diarréia causada por *E. coli* O157:H7 foram sanguinolentas, porém algumas vezes a diarréia pode não ter essa característica. Os sintomas normalmente desaparecem após uma semana, no entanto, em 6% dos pacientes a CH evolui para SHU e, destes, 50% requerem hemodiálise. Em média 1% dos casos por *E. coli* O157 é fatal (Meng *et al.*, 2007).

Descrita pela primeira vez em 1955, SHU é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia, danos renais agudos e vários graus de complicações no sistema nervoso central, podendo resultar em morte ou disfunção renal crônica irreversível (Karmali, 1989; Tzipori *et al.*, 2004). Patologias renais causadas por SHU envolvem danos às células endoteliais glomerulares (Kodama *et al.*, 1999).

Uma pequena porção das pessoas com SHU tem sequelas para o resto da vida, como cegueira, paralisia e insuficiência renal. Muitas têm anormalidades leves na função renal muitos anos mais tarde (CDC, 2007). Aproximadamente 40% dos pacientes com SHU causada por STEC requerem diálise temporária até que se recuperem do episódio agudo (Tzipori *et al.*, 2004). Em média, 8% das pessoas que têm diarréia severa, ao ponto de procurarem auxílio médico, desenvolvem esta complicação (CDC, 2007). Com acompanhamento médico, a mortalidade nos casos de SHU é menor que 10% entre crianças, porém pode chegar a mais de 90% entre idosos (Tsai, 2003).

Primeiramente descrita em 1924, a PTT assemelha-se a SHU em suas características clínico-patológicas, mas difere nos sinais neurológicos. A doença apresenta um envolvimento sistêmico, sobretudo do sistema nervoso central (SNC), com formação intermitente de microtrombos e, consequentemente, está associada a sinais neurológicos variados. A febre é mais proeminente em PTT e a idade de maior incidência da doença é por volta de 30 anos (Karmali, 1989).

Mecanismos de patogenicidade

A patogenicidade de STEC é um mecanismo complexo e envolve um grande número de fatores de virulência, incluindo fatores de aderência, de modificação da superfície da célula hospedeira, invasinas, diferentes toxinas e sistemas de secreção que exportam essas toxinas e outros fatores de virulência, levando-os às células hospedeiras (Kuhnert *et al.*, 2000).

A mais importante característica de virulência é a produção de uma ou mais toxinas de Shiga, apesar de, isoladamente, não serem suficientes para causar os sintomas (Nataro e Kaper, 1998).

STEC produzem uma ou duas citotoxinas denominadas toxina de Shiga tipo 1 (Stx1) e tipo 2 (Stx2), das quais Stx2 é considerada fator de virulência primário para SHU (Tzipori *et al.*, 2004). Essas citotoxinas são também denominadas verotoxinas (VTs), uma vez que sua atividade biológica pode ser observada em culturas de células Vero, originárias de rim de macaco, ou

toxinas *Shiga-like* (SLTs), já que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenterieae* tipo 1), causador da disenteria bacilar (Nataro e Kaper, 1998).

Stx1 e Stx2 possuem propriedades em comum. Ambas são proteínas de peso molecular aproximado (70.000), termolábeis e se ligam ao mesmo receptor, Gb3 (Head *et al.*, 1991).

A toxina de Shiga é composta de uma subunidade A (32 kDa) e cinco subunidades B (7,5 kDa cada). O modo geral de ação dessas toxinas envolve a adesão a um receptor glicolipídico (Gb3) na superfície da célula através das subunidades B e a internalização da subunidade A, que é enzimaticamente reduzida a um fragmento A1. Este, então, se liga à fração 60S dos ribossomos dos enterócitos para inibir a síntese protéica e interromper o funcionamento da célula (Karmali, 1989; Kodama *et al.*, 1999).

Enquanto Stx1 apresenta pequenas variações em sua sequência de aminoácidos, constituindo um grupo mais homogêneo, diversas variantes de Stx2 (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g), com características antigênicas e biológicas alteradas, têm sido descritas, e esta variabilidade reflete, primariamente, uma diversidade na sequência da subunidade B destas toxinas (Guth, 2008).

Dados epidemiológicos sugerem que Stx2 é mais importante do que Stx1 no desenvolvimento de SHU. Relatos indicam que cepas de *E. coli* O157:H7 que expressam Stx2 apenas são mais prováveis de estarem associadas a SHU do que cepas que produzem apenas Stx1 ou, até mesmo, do que aquelas que produzem tanto Stx1 como Stx2 (Nataro e Kaper, 1998).

Outros fatores de virulência necessários para a patogenicidade de STEC encontram-se em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*). Nesta região estão localizados os genes que codificam para a formação de lesões no intestino do hospedeiro do tipo *attaching and effacing* (AE), ou adesão íntima e destruição das microvilosidades. Várias etapas, segundo Nataro e Kaper (1998), estão envolvidas na produção dessas lesões, como aderência localizada, transdução do sinal e aderência intima.

As lesões AE são mediadas pela intimina, uma proteína codificada pelo gene *eae* que está localizado na ilha de patogenicidade LEE. A intimina é responsável pela aderência da bactéria nas células intestinais do hospedeiro. Em decorrência, ocorrem alterações no citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Por haver ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades, há eliminação de sangue nas fezes (Nataro e Kaper, 1998).

Além da intimina, LEE também codifica o sistema de secreção tipo III (TTSS), composto por um complexo de proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e efetoras (EspF, EspG, EspH, EspZ e Map), assim como Tir, o receptor para intimina (Sperandio *et al.*, 1998). A formação de uma relação estável entre a intimina e Tir é que determina a consequência da interação da proteína intimina envolvendo os componentes do hospedeiro e da bactéria (Frankel *et al.*, 2001).

O TTSS é responsável pela secreção e translocação de fatores de virulência e proteínas. EspA é uma proteína estrutural que interage com a célula hospedeira durante os primeiros estágios de formação da lesão AE. Essa proteína é essencial para a translocação de EspB e Tir para a célula hospedeira. Os filamentos de EspA têm uma estrutura cilíndrica que forma um canal pelo qual as proteínas são levadas à célula hospedeira. EspD, cuja função não é completamente entendida, pode ser também um componente dos filamentos de EspA. EspB está envolvida na formação do canal de translocação na membrana da célula hospedeira (Nataro e Kaper, 1998).

Enquanto EspA, EspB e EspD participam do TTSS, as proteínas efetoras são injetadas juntamente com Tir no citoplasma do enterócito. Embora essas proteínas não sejam essenciais para o estabelecimento da lesão AE, estão envolvidas em uma série de alterações nos enterócitos, como morte celular por apoptose, disfunção em mitocôndrias e diminuição da barreira defensiva da mucosa intestinal. Tir, além de agir como receptor da intimina, funciona como elemento de ligação e mobilização de filamentos de actina no enterócito (Gomes e Trabulsi, 2008).

Marcadores de virulência

A produção de entero-hemolisina (Ehx), que é uma hemolisina da família de toxinas citolíticas, é considerada um marcador de virulência de STEC por estar associada a isolados provenientes de doenças humanas, como CH e SHU (Cookson *et al.*, 2007; Guth, 2008) e com cepas produtoras do gene *eae* (Bastos *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008), porém seu exato papel na patogenicidade é desconhecido.

Ela é codificada pelo plasmídeo pO157, de 60 MDa, que contém o lócus para o gene *ehx*, e onde também se encontram diversos genes de virulência (Cookson *et al.*, 2007; Saitoh *et al.*, 2008).

A entero-hemolisina está relacionada à α-hemolisina, havendo 60% de homologia em suas sequências e, assim como α-hemolisina, a entero-hemolisina tem atividade lítica em células de carneiro. No entanto, a expressão da entero-hemolisina requer incubação *overnight* em ágar preparado com sangue de carneiro, ao contrário da α-hemolisina, que se expressa mais rapidamente, necessitando apenas de 3 horas de incubação para apresentar hemólise (Cookson *et al.*, 2007).

Apesar do gene *ehxA* ser encontrado em muitos sorotipos de STEC, diversos sorotipos portadores desse gene, incluindo O157:H- e O111:H-, podem não exibir o fenótipo entero-hemolítico em placas de ágar com sangue de carneiro, o que indica que as precisas condições para a regulação e expressão do gene que codifica para a produção da entero-hemolisina ainda não foram completamente determinadas (Cookson *et al.*, 2007).

Ainda que o papel exato da Ehx nas doenças intestinais não esteja elucidado, Nataro e Kaper (1998) sugerem que a Ehx possa aumentar os efeitos da Stx. Segundo Paton e Paton (1998), é possível que a hemoglobina liberada pela ação da Ehx seja uma fonte de ferro, estimulando a multiplicação de STEC no intestino. Cookson *et al.* (2007) sugerem que o gene *ehx* pode ainda estar associado à cepas de *E. coli* que não possuem fatores de virulência bem reconhecidos, como *stx* e *eae*, e que o fenótipo entero-hemolítico não está, necessariamente, envolvido com a virulência, mas pode ter um papel na sobrevivência fora do trato intestinal sob condições em que elementos como o ferro são requeridos para sua manutenção.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

A enzima β-glucuronidase (GUD) é um dos produtos do metabolismo de *E. coli*, incluindo as cepas patogênicas, com exceção apenas do sorotipo O157:H7. Desta forma, o fenótipo GUD-negativo é frequentemente utilizado para diferenciar *E. coli* O157:H7 de outras *E. coli*. A produção da enzima GUD é codificada pelo gene cromossômico *uidA*. Porém sua atividade está ausente em cepas de *E. coli* O157:H7 devido à mutações apresentadas pelo gene. Feng (1993) e Monday *et al.* (2001) propuseram o uso de um *primer* baseado neste gene que permite a detecção desse sorotipo.

Associação a alimentos

E. coli está presente no intestino de animais, principalmente de bovinos, sem causar doenças. STEC já foi isolada de fezes de aves, caprinos, ovinos, suínos, cães e gatos (Hammermueller *et al.*, 1995; Pilipcinec, 1999; Zschöck *et al.*, 2000; Bentacor *et al.*, 2007; Ateba *et al.*, 2008).

Alimentos de origem animal, em especial carne moída, têm causado muitos surtos nos Estados Unidos, na Europa e no Canadá. O mais recente ocorreu entre abril e junho de 2009, e envolveu 23 pessoas de nove estados dos Estados Unidos. O sorotipo O157:H7 foi identificado e dois pacientes desenvolveram a SHU. Em 1993, o maior surto de *E. coli* O157, que afetou mais de 700 pessoas, levando 7,5% destas a SHU e quatro a morte, foi relacionado ao consumo de hambúrgueres servidos por uma rede de *fast-food* em Washington, Nevada, Oregon e na Califórnia (CDC, 2009).

No entanto, carnes e produtos cárneos não são a única forma de transmissão de *E. coli*. O patógeno pode ser transmitido por leite cru, água, frutas e vegetais contaminados e também pelo contato com animais ou interpessoal, inclusive pelo uso de piscinas (Bhunia, 2008). O CDC relata, em 2006, dois grandes surtos associados à vegetais nos Estados Unidos. Em um deles, envolvendo 26 estados, as pessoas afetadas (199 com 3 mortes) haviam consumido salada de espinafre e no outro, que ocorreu pouco tempo depois e atingiu cinco estados com 71 afetados, o consumo foi de alface (CDC, 2009).

Gado bovino como reservatório de STEC

O gado é considerado um importante e assintomático reservatório desse patógeno, apesar da colonização do intestino e do modo de eliminação não estarem bem definidos. Os animais são colonizados transitoriamente e eliminam *E. coli* O157:H7 nas fezes por um curto período de tempo (Nataro e Kaper, 1998). A concentração de *E. coli* O157:H7 em fezes de gado varia de 10^2 a 10^5 UFC/g (Alam e Zurek, 2006).

Em muitos países foi encontrada prevalência de 60% de STEC em rebanhos bovinos, mas na maioria dos casos a prevalência é de 10 a 25% (Meng *et al.*, 2007).

No Brasil, o primeiro relato de *E. coli* O157:H7 isolada de gado ocorreu em 1999, quando Cerqueira *et al.* analisaram amostras de fezes de 197 bovinos de corte e leiteiro saudáveis no Rio de Janeiro. STEC foi detectada em 71% (139/197) dos animais sendo que 1,5% (3/197) deles possuíam o sorotipo O157:H7. No país, no entanto, a grande maioria dos relatos de isolados de STEC é de cepas não-O157.

Em um estudo onde foram coletadas 153 amostras de fezes de gado selecionado em seis fazendas leiteiras no estado de São Paulo, a porcentagem de STEC isolada variou entre 3,8 e 84,6% dependendo da fazenda analisada. STEC foi identificada em 25,5% (39/153) dos animais e, dentre estes, 84,6% (33/39) eram saudáveis. Nenhuma diferença significativa na porcentagem de isolamento do microrganismo foi observada entre os animais saudáveis (33/125, 26,4%) e os diarréicos (6/28, 21,4%) (Irino *et al.*, 2005).

Leomil *et al.* (2003) analisaram amostras de fezes de 139 bezerros com diarréia e 205 bezerros saudáveis e detectaram STEC em 20% (28/139) dos animais com diarréia e em 7,8% (16/205) dos animais saudáveis. Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007), em trabalho semelhante, detectaram o microrganismo em 12% (31/264) dos animais diarréicos e em 8,5% (24/282) dos animais saudáveis.

Outro trabalho, analisando amostras de fezes de 173 bezerros diarréicos em São Paulo, detectou STEC em apenas 5,2% (9/173) dos animais (Rigobelo *et al.*, 2006b).

Em Minas Gerais, Oliveira *et al.* (2008) analisaram, dentre outros, 102 bovinos saudáveis destinados ao corte e detectaram STEC em 39,2% (40/102) deles. *E. coli* O157 foi observada em apenas um animal.

Em Pelotas, RS, Moreira *et al.* (2003) avaliaram 243 animais saudáveis de 60 fazendas leiteiras e detectaram STEC em 49% (119/243) dos animais, sendo que 95% (57/60) das fazendas apresentaram ao menos um animal portador do microrganismo.

Pigatto *et al.* (2008), no Paraná, analisaram amostras de fezes de 190 animais saudáveis de 43 abatedouros diferentes e detectaram STEC em 36% (69/190) dos animais. Dos abatedouros analisados, 63% (27/43) tinham animais portadores de STEC.

Os dados sobre a ocorrência de STEC em carnes e produtos cárneos no Brasil são bastante limitados. Em 1997, Cerqueira *et al.* detectaram STEC em 19% (20/105) das cepas de *E. coli* isoladas de produtos cárneos crus comercializados no Rio de Janeiro, prevalência considerada alta. Em 2007, Bergamini *et al.* não detectaram o microrganismo em nenhuma das 136 amostras de carne crua moída adquiridas em Campinas, SP, mas detectaram-no em 3,5% (4) das 114 adquiridas em Ribeirão Preto, SP.

Em outros países, no entanto, os dados contrastam com os obtidos no Brasil. Nos Estados Unidos, Elder *et al.* (2000) estimaram a frequência de contaminação nas fezes, no couro e na carcaça de gado durante o processamento. Dos 29 lotes onde fezes e couro foram analisados, 72% tinham pelo menos uma amostra fecal positiva para *E. coli* O157 e 38% tinham amostras de couro positivas. A prevalência de *E. coli* O157 nas fezes e no couro foi de 28% (91/327) e de 11% (38/355), respectivamente. Dos 30 lotes onde a carcaça foi analisada, 87% apresentaram pelo menos uma amostra positiva para *E. coli* O157 na pré-evisceração, 57% na pós-evisceração antes de intervenção antimicrobiana, e 17% no pós-processamento. A prevalência de *E. coli* O157 nestas três etapas foi de 43% (148/341), 18% (59/332) e 2% (6/330), respectivamente. Alam e Zurek (2006) avaliaram 891 amostras de fezes de bovinos e detectaram *E. coli* O157:H7 em 9,2% (82/891) delas.

Na Austrália, STEC foi detectada em 16,7% (98/588) das amostras de fezes de bovinos analisadas por Cobbold e Desmarchelier (2000). Destas 98 amostras, 11,2% (10/98) apresentaram a presença de *E. coli* O157:H7.

Na África do Sul, Abong'o e Momba (2009) detectaram o microrganismo em 2,8% (5/180) dos produtos cárneos analisados e Sarimehmetoglu *et al.* (2009), na Turquia, observaram a presença de *E. coli* O157 em 7,6 % (19/251) das amostras de carne moída analisadas.

Na Itália, Alonso *et al.* (2007) analisaram as fezes e carcaças de 45 animais e detectaram a presença de *E. coli* O157:H7 em 12 deles, sendo 11 positivos nas fezes e cinco em carcaças.

No Canadá, Van Donkersgoed *et al.* (1999) detectaram STEC não-O157 em 42,6% das 1247 amostras de fezes e em 6,4% das amostras 373 de rumem de gado. O sorotipo O157:H7 foi observado em 7,5% das amostras de fezes e em 0,8% das de rumem.

Fontes de contaminação durante o abate de bovinos

Entre os fatores que afetam a prevalência dos microrganismos em carne fresca, podem ser incluídos o tipo de alimentação do animal, o transporte, o processo de abate e o uso de antimicrobianos. O manuseio e o transporte do pasto à planta de processamento podem deixar os animais estressados, o que pode aumentar a liberação de material fecal e patógenos, contaminando o couro dos animais, conforme constatado por Barham *et al.* (2002). O veículo de transporte é considerado uma possível fonte de patógenos, e é provável que os animais transportados na parte inferior apresentem maior prevalência de patógenos do que os transportados na parte superior (Reicks *et al.*, 2007). Se tais meios de transporte não forem limpos e sanitizados entre as viagens é possível que ocorra contaminação de outros animais, do ambiente de abate e até mesmo de animais de outras fazendas (Barham *et al.*, 2002).

Cobbold e Desmarchelier (2000, 2001) demonstraram que por volta do período de desmame, bezerros apresentam maior risco de transmissão do patógeno, tanto para humanos quanto para o gado, por excretarem uma porcentagem maior de STEC e *E. coli* O157 do que o restante do rebanho.

A contaminação microbiana da carne pode ocorrer durante o abate pelo couro do animal carregando fezes, poeira e sujidades do ambiente ou por

contato direto com fezes ou conteúdo do trato intestinal durante a evisceração (Echeverry *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram que mais de 70% do couro do gado pode estar contaminado com *E. coli* O157:H7 no início do processo de abate (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Arthur *et al.*, 2004).

Uma vez na superfície da carcaça, o patógeno pode ser disseminado pela carne pelo manuseio dos operadores e pelos procedimentos de abate. A cabeça, que é a parte mais baixa do animal durante os primeiros estágios da esfola, é mais susceptível à contaminação do que outras partes da carcaça pelo espirrar e escorrer da água e contato com operadores e superfícies. A contaminação da carne da cabeça com *E. coli* O157:H7 pode apresentar um risco significante durante o processamento e procedimentos do abate, acarretando a contaminação de produtos finais, o que coloca a saúde do consumidor em risco (Carney *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

Gerais

Avaliar a prevalência e caracterizar cepas de *E. coli* O157:H7 e outras cepas produtoras de toxina de Shiga (STEC) em isolados provenientes do couro dos animais e de suas respectivas carcaças, na etapa de pré-evisceração, e meia-carcaças, na etapa de pós-evisceração.

Específicos

- Identificar os fatores de virulência (stx_1, stx_2, *eaeA* e *ehxA*) dos isolados obtidos;
- Evidenciar cepas de *E. coli* O157:H7 através da pesquisa do gene *uidA*;
- Verificar a citotoxicidade em células Vero e a produção de entero-hemolisina;
- Avaliar a sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos;
- Identificar os sorotipos dos isolados de STEC e
- Verificar a sensibilidade dos métodos empregados para enumeração e detecção de STEC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte do programa *ProSafeBeef,* uma iniciativa da União Européia, coordenado pela Teagasc, na Irlanda, envolvendo 41 parceiros de 18 países. O objetivo deste programa é possibilitar o desenvolvimento e a diversificação da cadeia de carne na Europa além de permitir a distribuição de carne e produtos cárneos seguros microbiologicamente e de alta qualidade para mercados nacionais, regionais e globais. O programa abrange sete diferentes pilares e, dentre eles, um visa a qualidade microbiológica. Assim, para que os resultados obtidos pudessem ser comparados, as metodologias adotadas, em um primeiro momento, foram aquelas internacionalmente reconhecidas.

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na Universidade de São Paulo.

Todos os meios de cultura empregados foram da marca Oxoid (Basingstoke, Hampshire, UK), exceto quando citado.

3.1 Materiais

3.1.1 Coleta das amostras

Durante o período de 12 meses (janeiro à dezembro de 2008), foram coletadas amostras de couro na etapa pós-sangria e de carcaça na pré-evisceração (logo após a esfola), como demonstrado na Figura 03, de 198 bovinos abatidos em um frigorífico com atuação no mercado de exportação, podendo exportar, inclusive, para a União Européia, situado no estado de São Paulo, Brasil. Destes animais, 85 também tiveram amostras coletadas em meia-carcaça na etapa pós-lavagem.

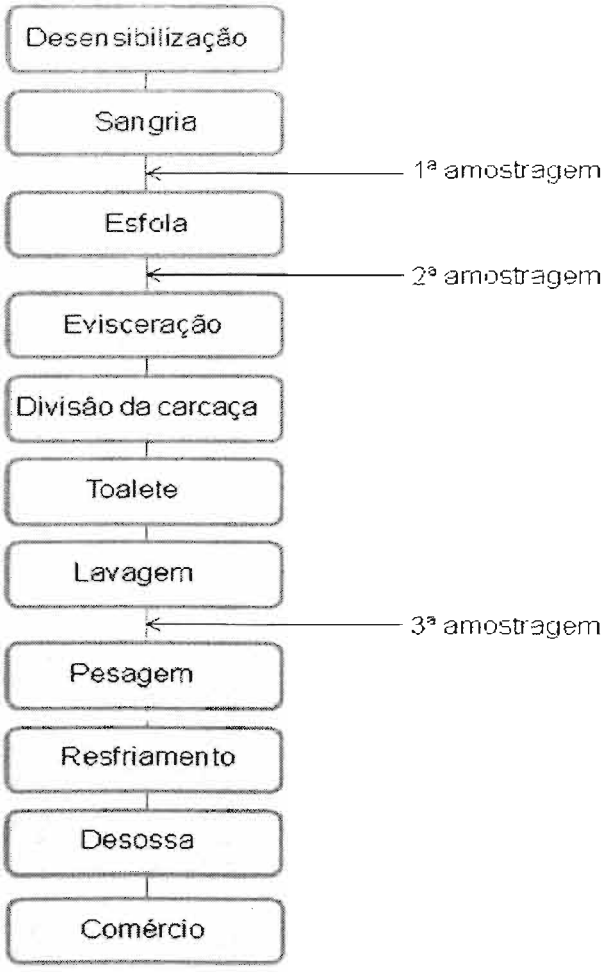

Figura 03 – Fluxograma do processo de abate no frigorífico e pontos de coleta.

A amostragem foi realizada por meio da técnica de esfregaço de superfície com o auxílio de quatro esponjas (Whril-Pak, Nasco, USA) por animal (Figura 04). Essas esponjas, umedecidas individualmente em 10 mL de solução salina peptonada (0,1% peptona, 0,85% NaCl), foram esfregadas horizontalmente e verticalmente (10 vezes em cada direção) na região do peito do animal, em uma área de 100 cm^2 cada, totalizando 400 cm^2. Para as amostras de meia-carcaça foram utilizadas duas esponjas para cada metade da carcaça. Posteriormente, essas esponjas foram depositadas em um saco plástico estéril devidamente identificado com o número do animal e o ponto de amostragem. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP em até 8 horas.

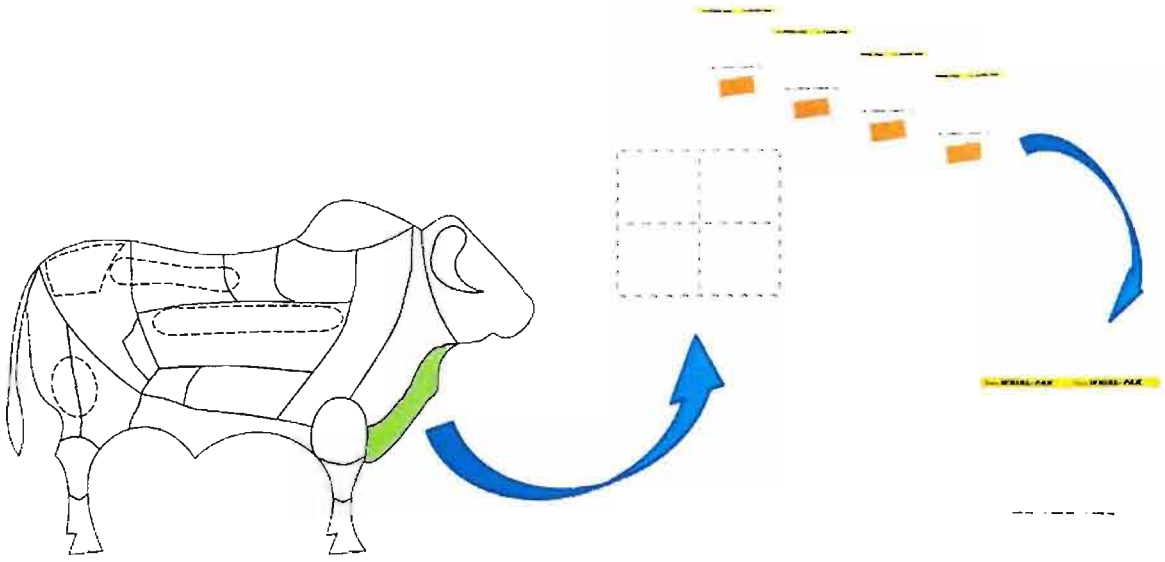

Figura 04 - Esquema da amostragem utilizando a técnica de esfregaço de superfície.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das amostras de couro e carcaça de bovinos

No laboratório, adicionaram-se 200 mL de solução salina peptonada aos sacos plásticos contendo as esponjas e estes foram agitados em *stomacher* (Stomacher, 400, Seward, UK) durante 30 segundos para uma melhor liberação dos microrganismos aderidos às esponjas (Figura 05). Em seguida, uma alíquota de 40 mL foi transferida para um tubo tipo Falcon (50 mL) que foi submetido à centrifugação (Sorvall RC-5C, Sorvall Instruments, USA) a 1000 g por 15 minutos a 5°C, e o sedimento foi ressuspendido em 100 mL de caldo triptona de soja modificado (acrescido de 1,5 g de bile salts n. 3 e 1,5 g de fosfato de potássio dibásico/1000 mL) adicionado de novobiocina (Inlab, Alamar Tecno-Científica) na concentração final de 20 mg/L (mTSB+N) apenas no momento de uso.

3.2.2 Enumeração de *Escherichia coli* O157 (ISO 16654, 1998)

Após homogeneização, foi feita diluição decimal seriada até 10^{-3} em solução salina peptonada e o restante do caldo mTSB+N foi incubado a 41,5°C por 12-18 horas para posterior detecção de *E. coli* O157 (Figura 05). A partir de cada diluição, 0,1 mL foi semeado em placas contendo ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) que foram incubadas a 37°C por 18-24 horas. Após este período, as colônias características foram enumeradas.

De 5 a 10 colônias suspeitas foram submetidas à série bioquímica nos meios EPM (Toledo *et al.*, 1982a), MILi (Toledo *et al.*, 1982b) e Citrato de sódio. As colônias apresentando características bioquímicas de *E. coli* foram submetidas à identificação sorológica utilizando o soro anti-*E. coli* O157 (Probac do Brasil).

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933 (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP).

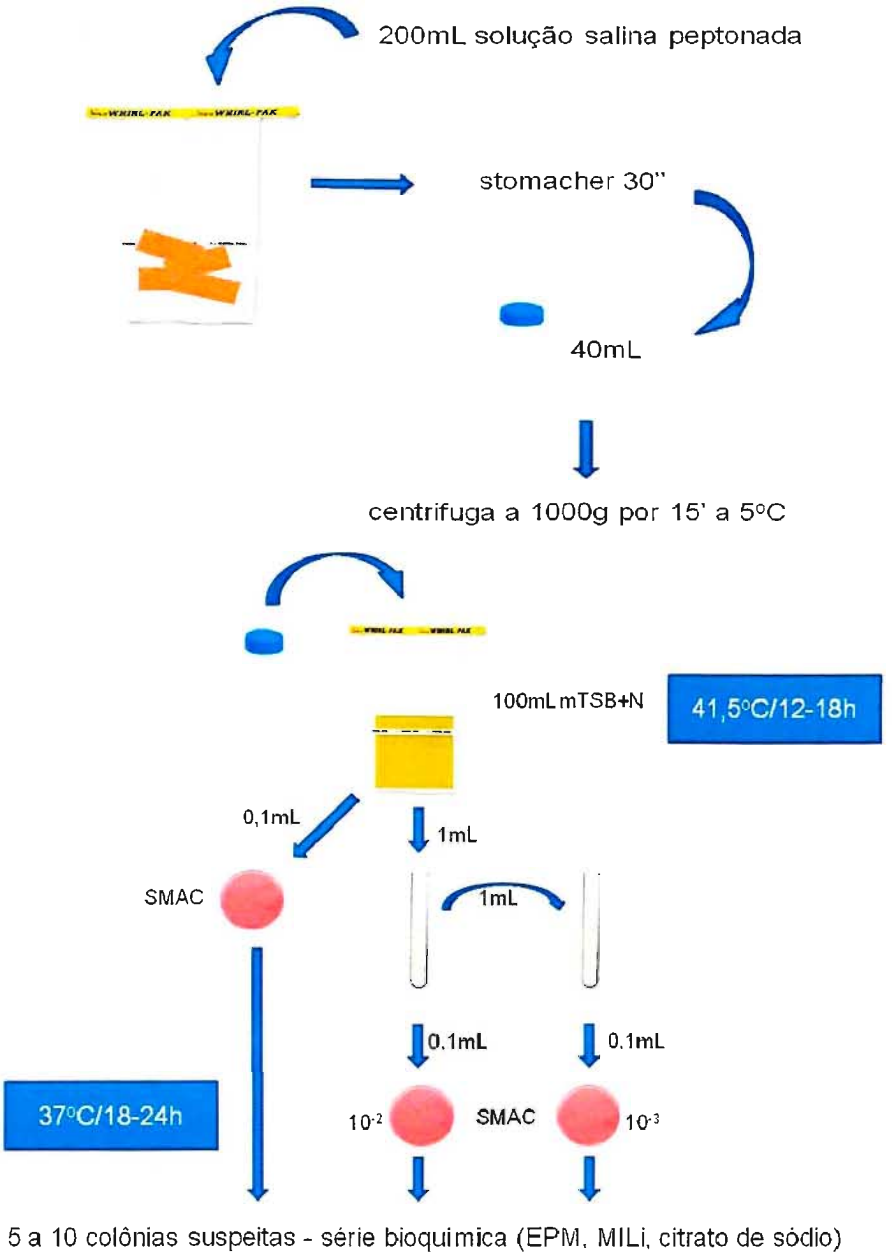

Figura 05 - Esquema da enumeração de *Escherichia coli* O157 de acordo com a ISO 16654 (1998).

(Nota da Biblioteca CQ: Não foi possível capturar a imagem fiel da Figura 05)

3.2.3 Detecção de *Escherichia coli* O157 (ISO 16654, 1998)

Transcorridas 12-18 horas da incubação do caldo mTSB+N a 41,5°C, seguiu-se à separação imunomagnética (IMS) utilizando Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway).

Em uma estante específica para IMS (Dynal Magnetic Particle Concentrator – MPC, Invitrogen), foram colocados microtubos de 1,5 mL aos quais foram adicionados 20 µL de Dynabeads anti-*E. coli* O157, devidamente homogeneizadas, e 1 mL da amostra enriquecida (Figura 06). Fechados os tubos, a estante foi invertida várias vezes e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos com leve agitação em um agitador (Dynal MX4 Sample Mixer, Invitrogen), para garantir a homogeneização da mistura. Após este período, uma placa magnética foi inserida na estante, permanecendo na lateral dos tubos, e esta foi inclinada diversas vezes para que um *pellet* (complexo partícula-bactéria) se formasse na parede dos tubos. A placa magnética permaneceu na estante por mais três minutos, para garantir a máxima captura das partículas, e os tubos foram abertos para retirada do sobrenadante. Removida a placa magnética, o *pellet* foi ressuspenso adicionando-se 1 mL de solução tampão (Anexo A). Todo o procedimento foi realizado por mais duas vezes, e a última ressuspensão do *pellet* foi feita com apenas 100 µL da solução tampão. Após breve homogeneização, 1 µL foi semeado com o auxílio de uma alça padronizada (Copan Diagnostics Inc., Corona, USA) em uma placa contendo ágar SMAC. O restante foi distribuído em placas contendo CHROMagar O157 (Invitrogen) e ágar SMAC adicionado de telurito de potássio e cefixima (TC-SMAC), que foram incubadas a 37°C por 18-24 horas.

De 5 a 10 colônias suspeitas de cada placa foram submetidas à série bioquímica. A identificação sorológica do antígeno somático O157 foi realizada como descrito no item 3.2.2.

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933.

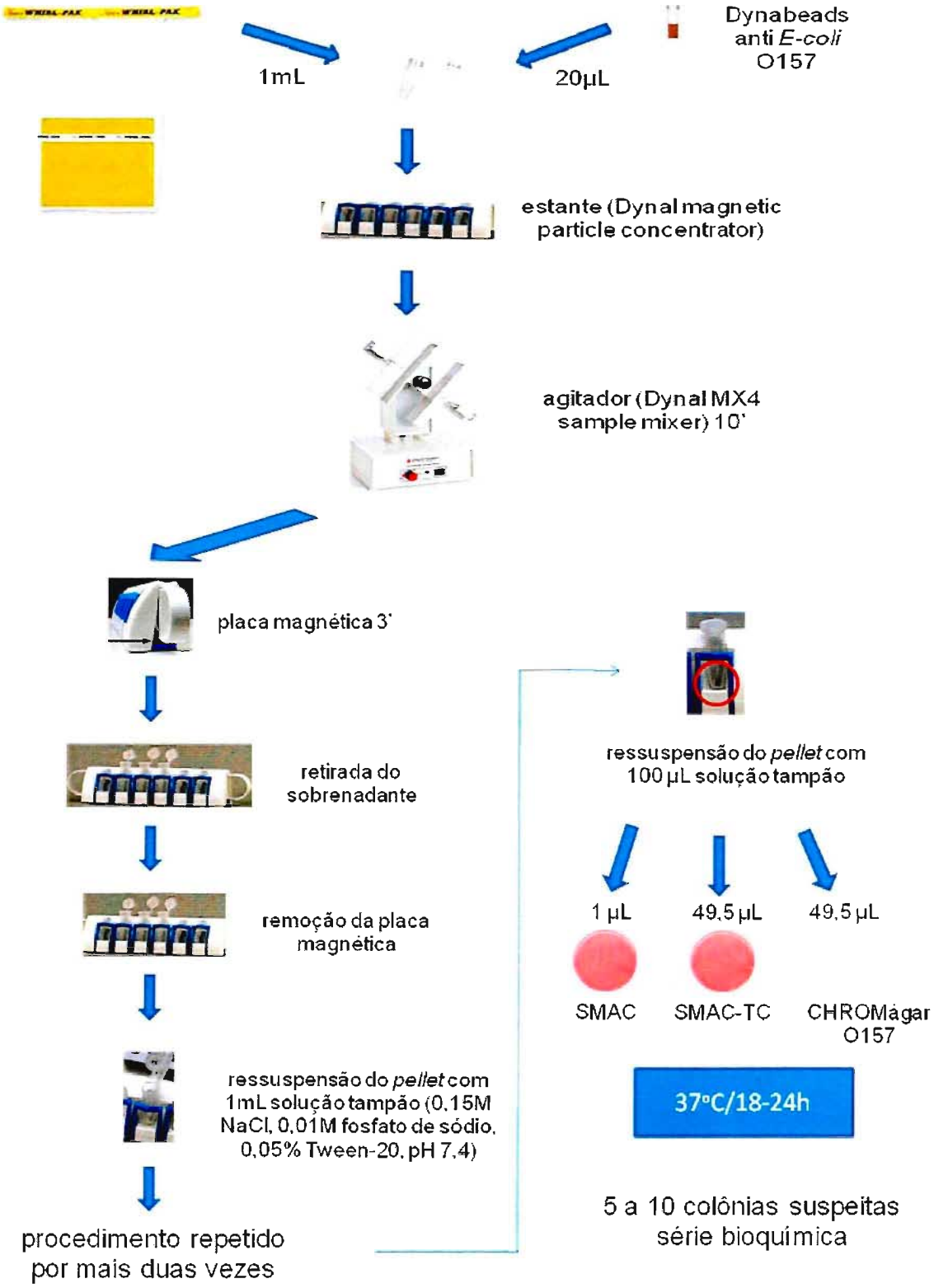

Figura 06 - Esquema da detecção de *Escherichia coli* O157 de acordo com a ISO 16654 (1998).

(Nota da Biblioteca CQ: Não foi possível capturar a imagem fiel da Figura 06)

3.2.4 Avaliação da sensibilidade dos métodos empregados para enumeração e isolamento de *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 EDL-933 foi cultivada em 3 mL de TSB *overnight* e uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada. A partir deste tudo, foi feita diluição decimal seriada até 10^{-9} e 1 mL de cada uma destas diluições foi inoculado em uma área de 100 cm^2 de bifes de carne bovina adquiridos no varejo. Após 30 minutos, foi empregada a técnica de esfregaço de superfície com o auxílio de uma esponja, como descrito nos itens 3.1.1 e 3.2.1. Em seguida, a mesma metodologia descrita nos itens 3.2.2, para enumeração, e 3.2.3, para detecção, foram realizadas.

Para confirmação da recuperação de *Escherichia coli* O157:H7, tanto por meio da enumeração quanto da detecção, de 5 a 10 colônias suspeitas foram submetidas à identificação sorológica utilizando o soro anti-*E.coli* O157.

Esta avaliação foi repetida por, no mínimo, três vezes para cada diluição inoculada na carne e o resultado expresso (por cm^2) é uma média dos resultados obtidos nas diferentes repetições.

3.2.5 Pesquisa dos genes para stx_1 e stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*

3.2.5.1 Preparo do DNA

As colônias apresentando características bioquímicas de *E. coli* e as cepas padrão foram semeadas em ágar nutriente e incubadas a 37℃ *overnight*. Uma porção da cultura foi homogeneizada em microtubos contendo 300 µL de água Milli-Q (Millipore, Billerica, USA) estéril e submetida a aquecimento em banho seco (AccuBlock – Digital Dry Bath, Labnet, Edison, USA) a 100℃ por 10 minutos. Após o banho, os tubos foram imediatamente resfriados em gelo, submetidos à centrifugação a 14000 g por 30 segundos em centrífuga 5417C (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e congelados a -20℃ até o momento de serem utilizados.

3.2.5.2 Reação de PCR

Foi conduzida uma PCR multiplex para os genes *stx_1, stx_2, eaeA, uidA* e *ehxA*, segundo metodologia descrita por Feng e Monday (2000). A sequencia dos *primers* utilizados está apresentada na Tabela 02.

A PCR multiplex foi realizada empregando-se o *kit* GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA), onde a 12,5 µL desse *kit* foram adicionados 300 nM de cada *primer* (IDT, Coralville, USA), e 3 µL do DNA teste (preparado como descrito em 3.2.5.1) para um volume final de reação de 25 µL.

A amplificação foi realizada através de um aquecimento inicial a 95℃ por três minutos seguido de 25 ciclos de um minuto a 94℃; um minuto a 56℃ e um minuto a 72℃ e uma extensão final por sete minutos a 72℃ em termociclador Matercycler ep gradient S (Eppendorf). Os produtos da PCR, se não submetidos imediatamente à eletroforese, foram armazenados a -20℃.

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933 e como controle negativo a cepa *E. coli* K12 (Instituto Adolfo Lutz), além de um controle negativo para a reação, utilizando água Milli-Q estéril em substituição ao DNA teste.

Tabela 02 – *Primers* utilizados para detecção dos genes stx_1, stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA* por PCR, segundo Feng e Monday (2000).

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)
stx_1	F: cag tta atg tgg tgg cga agg R: cac cag aca atg taa ccg ctg	348
stx_2	F: atc cta ttc ccg gga gtt tac g R: gcg tca tcg tat aca cag gag c	584
eaeA	F: att acc atc cac aca gac ggt R: aca gcg tgg ttg gat caa cct	397
ehxA	F: gtt tat tct ggg gca ggc tc R: ctt cac gtc acc ata cat at	158
uidA	F: gcg aaa act gtg gaa ttg gg R: tga tgc tcc atc act tcc tg	252

F: Forward
R: Reverse

3.2.5.3 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X [0,9 M Tris base (Pharmacia, Buckinghamshire, USA), 0,9 M ácido bórico (Pharmacia), 0,02 M EDTA (Pharmacia)], utilizando marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Gel XL Ultra V2 (Labnet) por 40 minutos a 100V, contendo TBE 0,5X.

Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($1\mu g.L^{-1}$) (Pharmacia), e a imagem foi registrada com o auxílio do sistema EDAS120 (Eastman Kodak, New York, USA), sob transiluminação UV 302 nm (Pharmacia LKB Macrovue, Pharmacia).

3.2.6 Pesquisa da atividade entero-hemolítica (Beutin *et al.*, 1989)

Foram submetidas à pesquisa da atividade entero-hemolítica as cepas que apresentaram as sequências stx_1 e/ou stx_2. Tais cepas, incubadas em TSB *overnight*, foram inoculadas em placas de ágar triptona de soja (TSA) suplementadas com 10 mM de $CaCl_2$ e 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado três vezes com tampão fostato salina (Anexo B).

As placas foram incubadas a 37°C e a presença da atividade hemolítica foi verificada após 3 e 24 horas de incubação. Cepas que apresentaram um halo de hemólise após 3 horas foram consideradas produtoras α-hemolisina e cepas com atividade hemolítica após 24 horas de incubação foram consideradas produtoras de entero-hemolisina.

Foram utilizadas como controle positivo as cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933 e *E. coli* α-hemolítica e como controle negativo a cepa *E. coli* K12 (Instituto Adolfo Lutz).

3.2.7 Avaliação da atividade citotóxica em células Vero (Gentry e Dalrymple, 1980)

As cepas de *E. coli* que apresentaram as sequências stx_1 e/ou stx_2 foram avaliadas quanto à produção de Stx através do teste de citotoxicidade em células Vero.

3.2.7.1 Preparo do sobrenadante das culturas de E. coli

As cepas a serem avaliadas e as cepas padrão foram semeadas em tubos contendo 5 mL de caldo Penassay (Anexo C) e incubadas por 18-24 horas a 37°C. Após esse período, 1,5 mL desta cultura foram transferidos para um microtubo e centrifugados por 10 minutos a 14000 g. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membranas esterilizantes (Millipore) de 0,22 µm de porosidade e mantidos a -20°C até a realização do t este.

3.2.7.2 Teste de citotoxicidade

Microplacas com 96 cavidades e fundo chato contendo cultura de células Vero em uma concentração aproximada de 150.000 células/cavidade foram adquiridas junto à na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz e transportadas imediatamente ao laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para execução do teste.

O meio presente nas placas [meio 199 adicionado de 1 mM de aminoácidos não essenciais e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil)] foi vertido e substituído por 80 µL do mesmo meio preparado no momento do uso. Em seguida, foram adicionados 20 µL dos sobrenadantes das cepas a serem testadas e das cepas padrão, todos em triplicata.

As placas foram incubadas em estufa de CO_2 (5%) a 37°C (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) por 24-48 horas, e a leitura realizada em microscópio invertido (Nikon, Tóquio, Japão), através da observação da lise celular, com leituras em 24 e 48 horas de incubação.

Foram utilizadas como controle positivo as cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933 e *E. coli* O157:H7 (Instituto Butantan) e como controle negativo a cepa *E. coli* K12.

3.2.8 Teste de resistência a antibióticos (Bauer *et al.*, 1966)

O teste de resistência a antibióticos foi realizado pelo método de disco-difusão com a utilização dos seguintes discos de antibióticos e respectivas concentrações: cloranfenicol 30 µg, cotrimoxazol 25 µg, tetraciclina 30 µg, estreptomicina 10 µg, ácido nalidíxico 30 µg, ampicilina 10 µg, gentamicina 10 µg e florfenicol 30 µg. Todos os discos de antibióticos foram da marca Sensifar. As zonas de inibição foram determinadas, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004).

As cepas foram incubadas *overnight* em TSB e diluídas com solução salina 0,85% até a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, 100 µL da solução foram inoculados em placas de ágar Mueller Hinton e semeados com o auxílio de uma alça de Drigalski de maneira a se obter um tapete. Aplicados os discos

de antibióticos, as placas foram incubadas a 37°C por 16-18 horas. A leitura foi realizada medindo-se o halo de inibição em milímetros.

Como controle positivo foi utilizada a cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933.

3.2.9 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. Kinue Irino do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP).

Foram utilizados anti-soros preparados na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, utilizando cepas de referência de *E. coli* recebidas do Centro Internacional de Referência (World Health Organization – WHO).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Presença de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

Foram amostrados 198 animais que totalizaram 481 amostras divididas em 198 amostras de couro, 198 amostras de carcaça e 85 amostras de meia-carcaça.

A presença de STEC foi observada em sete (3,5%) animais. Desses, seis (3,0%) apresentaram positividade em amostras de couro e um (0,5%) em amostra de meia-carcaça. Nenhuma das amostras de carcaça, na etapa de pré-evisceração, apresentou contaminação por STEC (Tabela 03).

Tabela 03 – Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) em amostras de couro, carcaça e meia-carcaça de bovinos em frigorífico com autorização para exportação para a União Européia.

Ponto de amostragem	Nº de amostras testadas	Nº (%) de amostras positivas
couro pós-sangria	198	6 (3,0%)
carcaça pré-evisceração	198	0 (0,0%)
meia-carcaça pós-evisceração	85	1 (0,5%)
Total	481	7 (3,5%)

Entre as colônias isoladas na enumeração e na detecção, 276 foram identificadas bioquimicamente como *E. coli* e submetidas à reação de

aglutinação com soro anti-*E. coli* O157 e à PCR para a presença dos genes stx_1, stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA* que codificam, respectivamente, para a produção da Stx1, Stx2, intimina, β-glucuronidase e entero-hemolisina. Os resultados característicos encontrados na PCR multiplex dos genes citados acima podem ser observados na Figura 07.

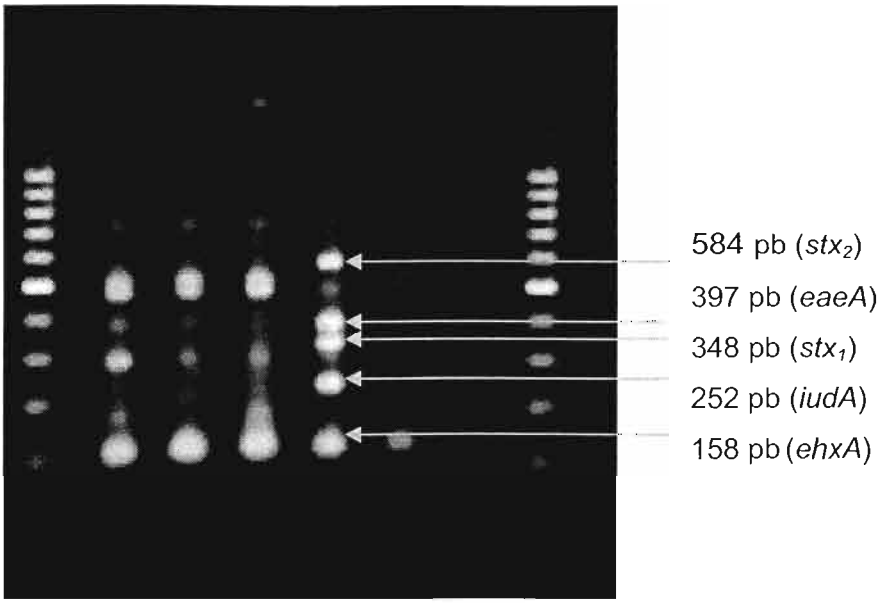

Figura 07 – Detecção dos genes stx_1, stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA* por PCR segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: *E. coli* K12.

Na Tabela 04 constam o perfil genético e sorotipo das cepas de STEC isoladas dos sete animais. Pode-se observar que, com exceção do isolado proveniente de meia-carcaça, que apresentou os genes stx_2, *uidA* e *ehxA*, os demais 23 isolados provenientes do couro apresentaram o perfil stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*.

Todos os 13 (54,2%) isolados do sorotipo O157:H7 apresentaram o perfil stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*. Outros sorotipos com o mesmo perfil foram O6:H49 (1 isolado), O46:H38 (2 isolados), O140:H21 (2 isolados), O174:H21 (1 isolado), O175:H7 (1 isolado), OR:H10 (2 isolados), ONT:H7 (1 isolado) e ONT:H8 (1 isolado).

Tabela 04 – Características das cepas de *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas dos sete animais.

Identificação do animal	Tipo de criação	Origem	Perfil genético	Sorotipo (n° de isolados)	Citotoxicidade em células Vero (n° de isolados)	Resistência à antimicrobianos (n° de isolados)
8	campo	meia-carcaça	*stx*$_2$, *uidA*, *ehxA*	ONT:H7 (1)	- (1)	-
22	campo	couro	*stx*$_2$, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O46:H38 (1)	+ (1)	-
24	campo	couro	*stx*$_2$, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H7 (2)	- (2)	-
				OR:H10 (2)	+ (1); - (1)	-
				O46:H38 (1)	+ (1)	-
				O140:H21 (1)	+ (1)	-
26	campo	couro	*stx*$_2$, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H7 (6)	+ (6)	-
				O140:H21 (1)	- (1)	est (1)
				ONT:H8 (1)	+ (1)	-
				O175:H7 (1)	+ (1)	-
46	campo	couro	*stx*$_2$, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H7 (1)	+ (1)	-
119	confinamento	couro	*stx*$_2$, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H7 (4)	+ (4)	est (1)
						est e amp (1)
				O6:H49 (1)	+ (1)	-
123	confinamento	couro	*stx*$_2$, *eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O174:H21 (1)	- (1)	est (1)

NT: não tipificável
R: rugosa
est: estreptomicina
amp: ampicilina

De todos esses isolados com perfil *stx_2*, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*, os seguintes sorotipos apresentaram positividade no teste de citotoxicidade em células Vero: O157:H7 (11 isolados), O6:H49 (1 isolado), O46:H38 (2 isolados), O140:H21 (1 isolado), O175:H7 (1 isolado), OR:H10 (1 isolado) e ONT:H8 (1 isolado) (Tabela 04).

O baixo número de STEC encontrado em carcaças e meia-carcaças neste trabalho corrobora os resultados encontrados por outros pesquisadores em estudos realizados no Brasil. Rigobelo *et al.* (2006a), ao caracterizarem cepas de *E. coli* isoladas de 80 carcaças (pré-evisceração, pós-evisceração e pós-processamento) em um frigorífico no estado de São Paulo, detectaram apenas uma amostra (1,2%) positiva para esse microrganismo que apresentou presença do gene *stx_2*. Posteriormente, entre 2006 e 2008, Rigobelo *et al.* (2008) analisaram 216 carcaças e detectaram STEC em três (1,4%) delas cujos isolados bacterianos apresentaram genes para Stx, sendo um positivo para *stx_1* e dois positivos para *stx_1* e *stx_2*, todos com ausência dos genes *eaeA* e *ehxA*. Assim como em nossa pesquisa, em nenhum destes estudos foi detectado o sorogrupo O157.

Von Laer (2009), no entanto, ainda em São Paulo, relata maior porcentagem de cepas de STEC em amostras de carcaça provenientes de animais criados em regime de confinamento. De 60 animais bovinos amostrados, cinco (8,3%) eram portadores de STEC. Destes animais, foram obtidas nove cepas de STEC, sendo seis positivas para *stx_1* e três para *stx_2*, e dentre os sorotipos encontrados, uma cepa pertencia ao sorotipo O157:H7.

Por outro lado, os resultados deste trabalho estão em desacordo com os de diversos autores de outros países, que relatam uma maior incidência de STEC, quer seja no couro dos animais, quer seja em suas carcaças (Elder *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2001; Rogerie *et al.*, 2001; Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Arthur *et al.*, 2002 e 2004; Bosilevac *et al.*, 2009; Nastasijevic *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, Bosilevac *et al.* (2009) detectaram a presença de *E. coli* O157:H7 em 71% e 33% das amostras de couro e carcaça (pré-evisceração), respectivamente, provenientes de 1.995 animais.

Elder *et al.* (2000) encontraram *E. coli* O157 em 11% (38 de 355) das amostras de couro, em 43% (148 de 341) das amostras de carcaça pré-evisceração e em 18% (59 de 332) das amostras de carcaça pós-evisceração. Com exceção de três amostras de carcaça pré-evisceração, todas as demais possuíam cepas portadoras dos genes stx_1 e/ou stx_2, *eaeA* e *ehxA*.

Barkocy-Gallagher *et al.* (2003), no meio-oeste americano, constataram a presença de *E. coli* O157 e STEC não-O157 em 60,6% e 56%, respectivamente, das 1.288 amostras de couro e em 26,7% e 58%, respectivamente, das 1.281 amostras de carcaça pré-evisceração estudadas.

Arthur *et al.* (2004), ainda nos Estados Unidos, avaliaram a presença de *E. coli* O157 em diversos pontos durante o abate de 288 animais. Do total de animais analisados, 76% apresentaram positividade em amostras de couro, 15% em amostras de carcaça pré-evisceração e 4% em amostras de carcaça pós-evisceração. Em 2002, Arthur *et al.* haviam detectado STEC em 180 (54%) de 334 carcaças amostradas na pré-evisceração.

Maior incidência de STEC em carcaças e meia-carcaças bovinas também é relatada por pesquisadores europeus, ao contrário do encontrado nesta pesquisa. Nastasijevic *et al.* (2009) detectaram *E. coli* O157 em 2,8% de 141 meia-carcaças analisadas na Sérvia. Rogerie *et al.* (2001) relataram a prevalência de STEC em 91 (10,7%) de 851 carcaças de gado saudável, pós-processamento, na França.

Outros países, no entanto, apresentam incidência menor, como relatado por Leung *et al.* (2001), em Hong Kong, e Varela-Hernández *et al.* (2007), no México, que detectaram a presença de STEC em 1,8% (18/986) e 0,8% (2/258) das carcaças bovinas analisadas na pós-evisceração.

No entanto, a baixa contaminação de carcaças e meia-carcaças por STEC em frigoríficos no Brasil contrasta com o elevado número de cepas detectadas em fezes de animais saudáveis ou com diarréia relatado em diversos estudos (Irino *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2005; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Farah *et al.*, 2007; Sandrini *et al.*, 2007;).

Sandrini *et al.* (2007) avaliaram a prevalência de STEC em 243 amostras de fezes de bovinos de leite da região de Pelotas, no Rio Grande do Sul, e detectaram o microrganismo em 95% (57/60) das propriedades estudadas e em 49% (119/243) dos animais testados.

No Paraná, Farah *et al.* (2007) detectaram STEC em 57% (61/107) dos animais analisados provenientes de 41 abatedouros.

Ao estudar 153 amostras de fezes de gado leiteiro em São Paulo, Irino *et al.* (2005) detectaram a presença de STEC em 39 (25,5%) animais, enquanto Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) observaram a prevalência de 10% de STEC dentre as amostras fecais de 546 animais estudados.

Ainda em São Paulo, Vicente *et al.* (2005) avaliaram 454 amostras de fezes de gado leiteiro da região de Jaboticabal e observaram a presença de STEC em 59,9% dos animais.

Esses dados sugerem que tem havido boas práticas de higiene nas etapas de remoção do couro e evisceração durante o abate desses animais no Brasil, uma vez que os relatos da presença em carcaças e meia-carcaças é baixo.

Esta diferença na prevalência de STEC em couros e carcaças bovinas entre o Brasil e outros países pode ser explicada pelo fato da maior parte do gado bovino em nosso país ser produzida em regime extensivo, sendo apenas uma pequena parte, cerca de 6% do total do gado abatido, produzida em regime de confinamento (Embrapa 2009).

Pela Tabela 04 pode-se observar que 100% das cepas de STEC apresentaram o gene para a produção de stx_2.

Ao estudar o perfil dos genes que codificam para as toxinas em isolados clínicos de *E. coli* O157:H7 em Washington, Ostroff *et al.* (1989) mostraram que pacientes infectados com cepas que carregavam apenas o gene stx_2 eram 6,8 vezes mais susceptíveis a desenvolver doenças severas, como SHU e PTT, do que aqueles infectados com cepas que carregavam o gene stx_1 ou stx_1 e stx_2. Segundo Boerlin *et al.* (1999), stx_2 é o fator de virulência mais associado a doenças em humanos, em especial as mais severas. Neste estudo, apenas cepas portadoras do gene stx_2 foram isoladas, o que pode representar um risco potencial à saúde humana.

Diversos pesquisadores no Brasil (Vicente *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2006; Cergole-Novella *et al.*, 2006; Farah *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2007; De Toni *et al.*, 2009) e em outros países (Beutin *et al.*, 1997;

Pradel *et al.*, 2000; Rogerie *et al.,* 2001; Orden *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2004; Padola *et al.*, 2004; Alam e Zurek, 2006; Alonso *et al.,* 2007) encontraram resultados similares ao estudar cepas provenientes de amostras de carcaça e fezes de gado e isolados clínicos.

No estado de São Paulo, Vicente *et al.* (2005) detectaram a prevalência de 31,5% do gene stx_2, 24% dos genes stx_1 e stx_2 e 4,4% do gene stx_1 ao estudarem o perfil das cepas de origem fecal obtidas de bovinos de leite.

Cergole-Novella *et al.* (2006) avaliaram o perfil genético de 107 cepas de STEC, sendo 42 provenientes de isolados de infecções humanas, 61 de fezes de bovinos de leite e de corte e quatro de carne moída. Os pesquisadores observaram a presença do gene stx_1 em 85,7% das cepas de origem humana, enquanto que o gene stx_2, em associação ou não ao stx_1, esteve presente em maior número nas cepas provenientes dos animais e de carne moída.

No Paraná, Farah *et al.* (2007) estudaram 64 cepas de STEC provenientes de amostras fecais de bovinos e observaram que 54,7% destas foram positivas para o gene stx_2, 3,1% para o gene stx_1 e 42,4% para ambos os genes.

De Toni *et al.* (2009) avaliaram 306 cepas de crianças com diarréia e detectaram seis (1,96%) STEC. Três delas apresentavam o gene stx_1 e as outras três o gene stx_2.

No Rio Grande do Sul, Timm *et al.* (2007), ao avaliarem amostras fecais de 100 animais, detectaram cepas produtoras dos genes stx_1 e stx_2 em 19 animais, cepas portadoras do gene stx_2 em 18 deles e cepas com gene stx_1 em apenas 8 animais. No total, 39% dos animais apresentaram cepas de STEC, sendo que alguns deles apresentaram cepas com diferentes perfis.

Bastos *et al.* (2006) estudaram 38 cepas de *E. coli* O157 isoladas de infecções humanas no Brasil e na América Latina e observaram que 77,8% delas carregavam apenas o gene stx_2. É importante ressaltar que Souza *et al.* (2007) relataram um caso de SHU ocorrido em São Paulo, em 2005, onde a cepa isolada carregava o gene stx_2.

Nos Estados Unidos, Alam e Zurek (2006) estudaram a prevalência de *E. coli* O157:H7 em fezes de bovinos e detectaram que 87,2% das cepas isoladas carregavam apenas o gene stx_2.

Alonso *et al.* (2007), na Itália, avaliaram amostras de fezes e carcaças de bezerros e observaram a prevalência de 85,6% do gene stx_2 entre as cepas de STEC. Na França, Rogerie *et al.* (2001) relataram prevalência de 60% do gene stx_2 em estudo similar, analisando 851 amostras de fezes e correspondente carcaça.

Pradel *et al.* (2000), na França, avaliaram, no período de uma ano, a presença de STEC em 2.143 amostras, sendo 471 de fezes de gado de corte saudável, 411 de carne, 603 de queijos e 658 de isolados clínicos. Das 220 cepas de STEC encontradas, 116 (53%) possuíam o gene stx_2, 70 (32%) carregavam tanto stx_1 como stx_2 e 34 (15%) apresentavam apenas o gene stx_1.

Orden *et al.*, (2002) observaram, pela PCR, 58,6% (41) de positividade para o gene stx_2, 22,9% (16) para o gene stx_1 e 17,1% (12) para ambos os genes ao estudarem 70 cepas de STEC provenientes de amostras de fezes de bovinos na Espanha.

Em 1997, Beutin *et al.*, na Alemanha, demonstraram que cepas de STEC portadoras do gene stx_2 são mais frequentemente isoladas de gado saudável. Nesse estudo, o gene stx_2 foi detectado em 75% (25/33) das cepas provenientes de 19 animais.

Na Argentina, Padola *et al.* (2004) relataram a prevalência de 45,8% (27/58) de cepas portadoras do gene stx_2, 11,9% (7/59) de cepas com ambos os genes e 5,1% (3/50) de cepas portando apenas o gene stx_1 ao estudarem amostras de fezes de bovinos de corte. Neste mesmo ano, Blanco *et al.*, na Espanha, caracterizaram 126 isolados humanos e observaram que os genes stx_1, stx_2, e stx_1+stx_2 encontravam-se distribuídos de maneira praticamente igual entre eles – 36% (45/126) das cepas carreavam o gene stx_2, 34% (43/126) delas o gene stx_1 e 30% (38/126) ambos os genes.

De acordo com Blanco *et al.* (1993), cepas de STEC carreadoras do gene stx_2 são parte da microbiota intestinal normal do gado, o que pode explicar a detecção mais frequente desta sequência.

No entanto, resultados divergentes dos observados neste estudo, onde a frequência de stx_1 ou ambos stx_1 e stx_2 foi maior do que de stx_2, também são relatados por diversos pesquisadores.

No Brasil, ao analisar amostras de fezes de gado de corte saudável, Leomil *et al.* (2003) e Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) verificaram a prevalência

de cepas portadoras do gene stx_1. Os relatos são de 50% para stx_1, 33,3% para stx_1/stx_2 e 16,7% para stx_2, e 46% para stx_1, 13% para stx_2 e 42% para ambos os genes, respectivamente.

Cerqueira *et al.* (1999) e Oliveira *et al.* (2008) observaram maior prevalência de cepas carreadoras dos genes stx_1 e stx_2: 58% para os genes stx_1/stx_2, 27% para stx_1 e 15% para stx_2, e de 54,4% para stx_1/stx_2, 15,6% para stx_1 e 30% para stx_2, respectivamente.

Ao caracterizarem cepas de gado leiteiro no estado de São Paulo, Irino *et al.* (2005) também observaram que a maioria das cepas de STEC apresentavam os genes stx_1 e stx_2 (114/202, 56,4%). A prevalência de stx_2 foi de 40,6% (82/2002).

Bielaszewska *et al.* (2009), em estudo retrospectivo, analisaram 100 cepas de STEC isoladas entre 1997 e 2007 de pacientes com SHU, diarréia sanguinolenta, diarréia aquosa, dores abdominais sem diarréia e assintomáticos da Alemanha, Áustria, Finlândia e Canadá, e detectaram a presença do gene stx_1 em 70% das cepas, stx_1 e stx_2 em 29% e stx_2 em apenas 1% delas.

Na Suíça, Blanco *et al.* (2005) observaram que 61,9% das cepas apresentaram o gene stx_1, 19% o gene stx_2 e 19% ambos os genes ao avaliar 21 cepas de STEC provenientes de 330 amostras de fezes bovinas.

Estes trabalhos sugerem que a ocorrência de stx_1 e/ou stx_2 varia conforme a localização geográfica e, de acordo com outros trabalhos, com a espécie do animal. Oliveira *et al.* (2008), por exemplo, determinaram o perfil de virulência de isolados fecais de STEC de gado bovino de corte e leiteiro e de cabras em Minas Gerais. Os isolados portadores de stx_1 corresponderam a 15,6% (28/180), 26,7% (16/60) e 24,1% (66/274) das cepas isoladas de gado de corte, gado leiteiro e cabras, respectivamente. Isolados portadores de stx_2 corresponderam a 30% (54/180), 53,3% (32/60) e 34,7% (95/274) das cepas de gado de corte, gado leiteiro e cabras, respectivamente, e os isolados portadores de stx_1 e stx_2 corresponderam a 54,4% (98/180), 20% (12/60) e 41,2% (113/274) das cepas em gado de corte, gado leiteiro e cabras, respectivamente.

Zschöck *et al.* (2000), na Alemanha, avaliaram o perfil genético de cepas de bovinos, ovinos e caprinos leiteiros e observaram o gene stx_1 nas cepas de

11,5% (15/131) dos bovinos, 66,7% (6/9) dos ovinos e 97,1% (68/70) dos caprinos, stx_2 nas cepas de 45,8% (60/131) dos bovinos, 33,3% (3/9) dos ovinos e 1,4% (1/70) dos caprinos e ambos os genes nas cepas de 42,7% (56/131) dos bovinos, nenhum ovino e 1,4% (1/70) dos caprinos.

Gilbert *et al.* (2005), na Austrália, avaliaram o efeito de diferentes dietas na prevalência de genes de virulência de EHEC nas fezes de gado. Os pesquisadores concluíram que o tipo de dieta tem efeito significante nas populações de *E. coli* e na concentração dos genes de virulência. De acordo com o tipo de alimentação fornecida, o animal pode ter uma população de EHEC maior ou menor, e o mesmo ocorre em relação aos genes de virulência. Neste estudo, os animais alimentados com fibras ou com fibras e melaço excretaram maiores concentrações de stx_1, *eaeA* e *ehxA* do que os animais alimentados com grãos. Estes resultados sugerem que, se os animais receberem uma dieta adequada antes de irem para o abatedouro, a prevalência de EHEC como contaminante nas carcaças pode ser reduzida.

De acordo com os genes apresentados na Tabela 04, os isolados bacterianos de amostras de couro podem ser classificados como EHEC pela presença do gene *eaeA*, além do stx_2. Do total de cepas de STEC (24) deste trabalho, 95,8% (23) possuem esse gene, o que está em acordo com os resultados obtidos por Vaz *et al.*, (2004) e Cergole-Novella *et al.* (2007), em São Paulo, que relataram a prevalência desse gene em 93,1% (27/29) e 93,9% (46/49), respectivamente, dos isolados de STEC provenientes de infecções humanas estudadas. O caso de SHU relatado por Souza *et al.* (2007), também ocorrido em São Paulo, foi causado por uma cepa que carregava o gene *eaeA*.

Resultados divergentes, no entanto, foram observados por Vicente *et al.* (2005), que verificaram a presença desse gene em 45,8% das 271 cepas de STEC obtidas de amostras de fezes de bovinos.

Resultados obtidos por Zweifel *et al.* (2005), na Suíça, mostram a presença desse gene em apenas 17% das capas de STEC isoladas de amostras fecais de 350 bovinos.

Na Alemanha, Zschöck *et al.* (2000) detectaram o gene *eaeA* em 8,5% das cepas de STEC provenientes de amostras fecais de 847 animais, porcentagem bem abaixo do obtido nesta pesquisa.

Na França, Rogerie *et al.* (2001) observaram a presença do gene *eaeA* em 3,2% das STEC isoladas de fezes de bovinos e 10,2% das isoladas de carcaça. Apenas três de 222 cepas (1,3%) apresentaram os genes de virulência *stx*, *eaeA* e *ehxA* em associação.

Em relação aos sorotipos, observa-se, na mesma Tabela, que dos sete (3,5%) animais portadores de STEC, cinco (71,4%) possuíam cepas do sorotipo O157:H7. Se considerarmos os isolados destes sete animais, 54,2% (13/24) eram deste sorotipo. Este dado está de acordo com o encontrado por muitos pesquisadores (Paton e Paton, 1998; Boerlin *et al.*, 1999; Adwan e Adwan, 2004; EFSA, 2006), onde o sorogrupo O157 está presente em maior número em relação aos outros sorogrupos sendo também o maior causador de doenças humanas.

Em 2005, na União Européia, 3.314 casos de doenças humanas causadas por STEC foram reportados por 18 países. Dentre os 1.717 casos confirmados, o sorogrupo mais isolado foi o O157 (69,9%), seguido dos sorogrupos O26 (6%), O103 (6,2%), O91 (3,2%) e O145 (1,8%). Outros sorogrupos somaram 12,9% e a faixa etária mais atingida foram as crianças de 0 a 4 anos (EFSA, 2006).

Van Donkersgoed *et al.* (1999), no Canadá, relataram a prevalência de 11% de *E. coli* O157:H7 dentre as cepas de STEC encontradas em fezes de animais.

Adwan e Adwan (2004), em Israel, avaliaram 300 amostras de carne bovina crua e identificaram STEC em 44 (14,7%) delas. Dentre as 44 cepas de STEC isoladas, 12 (27,3%) pertenciam ao sorogrupo O157.

Sarimehmetoglu *et al.* (2009), na Turquia, detectaram *E. coli* O157 em 7,6% (19/251) das amostras de carne moída analisadas.

Abong'o e Momba (2009), na África, estudaram 180 amostras de carne e produtos cárneos e detectaram a presença do sorotipo O157:H7 em 2,8% (5/180) delas.

No Brasil, no entanto, os dados sobre STEC em carcaças bovinas são escassos. A maioria dos trabalhos relata a presença de sorotipos encontrados em amostras de *swab* retal desses animais, como o de Oliveira *et al.* (2008), em Minas Gerais, que encontraram resultados semelhantes aos aqui apresentados. Foram identificados, dentre os isolados, os sorotipos O157:H7 (um animal), 06:H49 (um animal), O174:H21 (um animal) e ONT:H8 (quatro animais).

Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007), que analisaram amostras fecais de gado bovino saudável e diarréico em São Paulo, não detectaram o sorotipo O157:H7 porém o sorotipo O174:H21 foi uns dos mais isolados.

Cerqueira *et al.* (1997) analisaram 105 amostras de produtos cárneos no Rio de Janeiro e isolaram os sorotipos O46:H38 e ONT:H8. Em 1999, Cerqueira *et al.* estudaram amostras de fezes de 197 animais saudáveis e detectaram o sorotipo O157:H7 em três (1,5%) animais, sendo dois animais de gado leiteiro e um de gado de corte.

No Brasil, a incidência de doenças humanas devido a *E. coli* O157:H7 e outras STEC é relativamente baixa (Guth *et al.*, 2002c, 2005; Irino *et al.*, 2002, 2007; Souza *et al.*, 2007). No entanto, o isolamento de sorotipos previamente descritos e associados a doenças humanas severas (O157:H7, O174:H21, O6:H49, ONT:H7, ONT:H8, OR:H10) no Brasil e em outros países (Vaz *et al.*, 2004; Beutin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2004; Hussein, 2006) pode representar um risco para a população.

Dados divergentes dos encontrados neste trabalho foram relatados por Leomil *et al.* (2003), que detectaram apenas cepas de sorogrupos não-O157 ao analisarem amostras fecais de gado de corte diarréicos e saudáveis em São Paulo.

Irino *et al.* (2005) relataram a prevalência dos sorotipos O113:H21, O178:H19 e O79:H14, não encontrados neste estudo, dentre as amostras fecais de gado leiteiro, em São Paulo. Apenas dois isolados, de um mesmo animal, pertenciam ao sorotipo O157:H7.

Pesquisa do gene *uidA* na identificação do sorotipo O157:H7

A pesquisa do gene *uidA* foi proposta como ferramenta na identificação rápida de *E. coli* O157:H7, que não produz a enzima GUD mas apresenta o gene que a codifica. No entanto, a sequência do nucleotídeo do termino 5' do gene estrutural *uidA* de *E. coli* O157:H7 é idêntica ao das *E. coli* GUD positivas, exceto por uma substituição de 90 bases *downstream* do códon inicial (Feng, 1993). Assim, um oligonucleotídeo dirigido a esta região foi usado especificamente para identificar *E. coli* sorotipo O157:H7. No entanto, pela sorologia, observou-se que 11 cepas que apresentaram o gene *uidA* por PCR aglutinaram com soros de diversos outros sorotipos, fato também relatado por outros pesquisadores (Bouvet *et al.*, 2002; Von Laer, 2009).

Von Laer (2009), em São Paulo, detectou uma cepa, proveniente de amostras de fezes, portadora do gene *uidA* que, quando submetida à sorologia, não foi positiva para o sorotipo O157:H7.

Bouvet *et al.* (2002), na França, analisando amostras de carne e carcaça de porco e do ambiente de abate desses animais, detectaram três cepas, entre as 498 estudadas, com o gene *uidA*, porém, ao serem submetidas à sorologia, elas não foram positivas para o sorotipo O157:H7.

Pesquisa da atividade entero-hemolítica

De acordo com a literatura (Beutin *et al.*, 1989; Bielaszewska *et al.*, 2009), a pesquisa da atividade entero-hemolítica é um marcador epidemiológico útil, de rápida e simples detecção, pois está frequentemente associada (89%) à presença de Stx. No entanto, esta relação não foi observada neste estudo. Dos sete animais com cepas positivas para Stx e *ehxA*, apenas um (14,2%) apresentou cepas positivas na avaliação da produção de entero-hemolisina em placas de ágar sangue.

Resultados similares foram encontrados por Salvadori *et al.* (2003) ao analisarem o perfil de 205 cepas provenientes de bezerros com diarréia no Mato Grosso do Sul, Brasil. De 33 cepas de STEC detectadas, apenas 11

(35,5%) apresentaram positividade na avaliação da produção de entero-hemolisina. Ainda, Schmidt e Karch (1996), na Alemanha, ao investigarem os genótipos e fenótipos entero-hemolíticos de 36 cepas de pacientes portadores de SHU ou diarréia, constataram que somente o uso de placas de ágar sangue não é suficiente para detectar STEC uma vez que apenas 66% das cepas apresentaram o fenótipo hemolítico e algumas cepas podem carregar o gene porém não manifestá-lo fenotipicamente.

Assim, pode-se afirmar que as cepas de STEC dos sete animais possuem o gene para a entero-hemolisina porém não o estão expressando.

Avaliação da atividade citotóxica em células Vero

Das 24 cepas positivas para STEC, 19 (79,2%) apresentaram atividade citotóxica em células Vero, conforme apresentado na Tabela 04.

Alguns pesquisadores (Al-Galas *et al.,* 2002; Beutin *et al.,* 2004; Bergamini *et al.,* 2007) afirmam ter encontrado 100% das cepas de STEC com capacidade de destruir a monocamada de células Vero. Bergamini *et al.* (2007), ao analisarem 114 amostras de carne moída em Ribeirão Preto, SP, detectaram quatro (3,5%) amostras positivas para STEC e com citotoxicidade em células Vero.

Al-Galas *et al.* (2002), na Tunísia, obtiveram o mesmo resultado ao analisar três (1,5%) cepas de STEC provenientes de 204 produtos cárneos e de leite.

Beutin *et al.* (2004), na Alemanha, verificaram que 100% das 677 cepas de STEC de origem humana investigadas eram capazes de destruir a monocamada de células Vero.

No entanto, os resultados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com os observados por outros pesquisadores no Brasil (Cerqueira *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2006) e em outros países (Jinneman *et al.*, 2000; Zhang *et al.,* 2005).

Cerqueira *et al.* (1999), no Rio de Janeiro, RJ, observaram citotoxicidade em 13 (86,6%) das 15 cepas de STEC avaliadas. Bastos *et al.* (2006),

encontraram 32 (84,2%) cepas apresentando citotoxicidade em células Vero dentre as 38 cepas de *E. coli* O157 estudadas provenientes de infecções humanas, gado e alimentos no Brasil e em outros países da América Latina.

Jinneman *et al.* (2000), analisando seis cepas de *E. coli* O157:H7 provenientes de surtos envolvendo carne moída nos Estados Unidos, também encontraram 83,3% (1/6) de cepas com atividade citotóxica em células Vero.

Zhang *et al.* (2005), na Alemanha, detectaram 31 (83,8%) cepas de STEC, provenientes de humanos assintomáticos e com diarréia, com citotóxica em células Vero dentre as 37 estudadas. Segundo os autores, não há problemas estruturais no gene *stx* das cepas que não apresentaram atividade citotóxica, e sugerem que tais genes não tiveram origem em fagos ou estão localizados em fagos defeituosos. Afirmam, ainda, que a detecção fenotípica da Stx é insatisfatória nas cepas de STEC que secretam a toxina em baixas quantidades.

Avaliação da resistência a antibióticos

Dentre os oito antibióticos testados (cloranfenicol 30 µg, cotrimoxazol 25 µg, tetraciclina 30 µg, estreptomicina 10 µg, ácido nalidíxico 30 µg, ampicilina 10 µg, gentamicina 10 µg e florfenicol 30 µg), três animais portadores de STEC apresentaram cepas resistentes. No total, quatro (16,7%) das 24 cepas testadas apresentaram resistência a um ou mais antibióticos. Três (12,5%) o foram à estreptomicina e uma (4,2%) à estreptomicina e ampicilina, porém nenhuma cepa apresentou multi-resistência (resistência a três ou mais classes diferentes de antibióticos), como é descrito por vários pesquisadores (Meng *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; Rigobelo *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2009).

Bastos *et al.* (2006) relatam menor número de cepas resistentes a estreptomicina do que o encontrado neste trabalho. Das 38 cepas de *E. coli* O157 estudadas, três (7,9%) demonstraram resistência a estreptomicina, sendo uma proveniente de gado do Brasil, uma de gado da Argentina e uma de paciente com SHU também na Argentina.

No entanto, pode-se observar maior resistência tanto à estreptomicina quanto à ampicilina em muitos trabalhos, como o de Scott *et al.* (2009), na Irlanda, que analisaram 128 amostras de fezes de gado e solo e detectaram sete cepas de STEC, pertencentes a sete animais, das quais cinco eram resistentes à cinco ou mais antibióticos. Todas as cepas foram resistentes à estreptomicina e 71,4% (5/7) delas à ampicilina.

Na África, das cinco cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de 180 produtos cárneos por Abong'o e Momba (2009), duas (40%) foram resistentes a ampicilina. No teste não foi utilizada a estreptomicina.

Khan *et al.* (2002), na Índia, também relataram cepas de STEC resistentes a antibióticos. De 63 cepas estudadas, provenientes de humanos, bovinos e alimentos, 49,2% eram resistentes a um ou mais antibióticos e algumas apresentaram multi-resistência. Observou-se maior porcentagem de resistência a ampicilina (25,4%), tetraciclina (23,8%) e estreptomicina (14,3%).

Nos Estados Unidos, Meng *et al.* (1998), ao estudarem 118 cepas de *E. coli* O157:H7 e sete de O157:NM provenientes de humanos, animais e alimentos, constataram maiores índices de resistência (34%) entre os isolados bovinos estudados. Do total, 30 cepas (24%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado, sendo 29 (96,7%) delas resistentes a estreptomicina, e 24 (19%) a três ou mais antibióticos.

Em 2001, ainda nos Estados Unidos, Zhao *et al.* estudaram a susceptibilidade de 21 cepas de STEC não-O157 e 29 de *E. coli* O157:H7, também provenientes de humanos, animais e alimentos, frente a 17 antibióticos e verificaram que todas as *E. coli* O157:H7 testadas foram resistentes a pelo menos um antibiótico, e 76% delas mostraram resistência a estreptomicina e 14% a ampicilina. Várias demonstraram resistência múltipla, e o padrão mais comum foi o de resistência a estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina. Algumas foram resistentes a cinco antibióticos, incluindo estreptomicina e ampicilina. Dentre as STEC não-O157, 33% foram resistentes a ampicilina e 43% a estreptomicina. Esse trabalho demonstrou que cepas de STEC possuem integrons que codificam genes de resistência a antibióticos, o que poderia não apenas complicar futuramente a antibioticoterapia mas também estimular a transferência de genes de resistência. Além disso, tais cepas resistentes poderiam apresentar vantagens seletivas sobre outras bactérias que colonizam

o trato gastrointestinal de animais tratados com antibióticos, tornando-se dominantes. Em consequência, seriam excretadas em maior quantidade, o que levaria a uma maior contaminação dos animais por STEC, trazendo maior risco ao consumidor.

Em 2008, Rigobelo *et al.* também observaram que 62% das cepas de STEC apresentavam multi-resistência antimicrobiana (resistencia a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina). Segundo esses pesquisadores, como os genes de resistência a essas drogas estão ligados a plasmídeos, essa multi-resistência pode ter resultado da disseminação de elementos genéticos móveis entre cepas de STEC.

E. coli enteropatogênia (EPEC) sorogrupo O157

Oito cepas isoladas neste estudo, provenientes de dois animais amostrados no couro e três animais amostrados na carcaça, apresentaram os genes *eaeA*, *uidA*, *ehxA*, porém não os que codificam para a produção da Stx, não sendo, portanto, consideradas STEC (Tabela 05). Esses isolados poderiam ser classificados como EPEC, porém como não foi realizada a pesquisa para a presença do plasmídeo Eaf, elas não podem ser classificadas como típicas ou atípicas.

Além dos genes de virulência citados, quatro dos cinco animais apresentaram cepas do sorogrupo O157. Assim, podemos dizer que cepas de *E. coli* O157:H7 foram encontradas tanto entre STEC quanto EPEC. A prevalência de cepas de STEC e EPEC foi de 75% (24 cepas) e 25% (8 cepas), respectivamente.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Tabela 05 – Perfil genético e sorotipo das cepas de *Escherichia coli* não produtora de toxina de Shiga (não-STEC) isoladas dos cinco animais.

Identificação do animal	Origem	Perfil genético	Sorotipo (nº de isolados)
23	couro	*eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O175:H7 (1)
50	couro	*eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H- (1)
			ONT:H7 (1)
51	carcaça	*eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H- (2)
			ONT:H7 (1)
52	carcaça	*eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H- (1)
177	carcaça	*eaeA*, *uidA*, *ehxA*	O157:H7 (1)

NT: não tipificável
H-: não móvel

Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Alonso *et al.* (2007), que detectaram STEC e EPEC em 64,7% e 35,3%, respectivamente, das 90 amostras de fezes e de carcaças de 45 animais. O sorotipo O157:H7 foi isolado tanto entre cepas de STEC quanto de EPEC.

Blanco *et al.*, 2005, na Espanha, também relatam a presença do sorotipo O157:H7 tanto em cepas de STEC quanto de EPEC, no entanto, os pesquisadores detectaram porcentagens diferentes destes patógenos em relação ao encontrado neste trabalho. De 51 cepas selecionadas aleatoriamente, dentre 132 positivas para *eaeA* previamente isoladas de 330 amostras de fezes de bovinos, a presença de STEC e EPEC foi observada em 59% (3051) e 41% (2151), respectivamente, das amostras.

Recuperação de STEC por meio da enumeração e detecção utilizando o método da separação imunomagnética

Com exceção de uma cepa de STEC (1/24), todas as demais (95,8%) foram isoladas por meio da detecção utilizando o método da separação

imunomagnética (Tabela 06). De acordo com a avaliação da sensibilidade de recuperação dos métodos empregados para enumeração e detecção de *E. coli* O157:H7, foi possível detectar *E. coli* O157:H7 em concentrações tão baixas quanto 10^{-4}, enquanto que a enumeração foi possível apenas quando o microrganismo esteve presente em concentrações igual ou acima de 10^{3}, o que demonstra que o método de isolamento de *E. coli* O157:H7 por meio da separação imunomagnética é mais sensível.

Tabela 06 – Método de isolamento das cepas de STEC de acordo com animal e origem da amostra.

Identificação do animal	Origem	Método de isolamento (nº de cepas)
8	meia-carcaça	enumeração (1)
22	couro	detecção (1)
24	couro	detecção (6)
26	couro	detecção (9)
46	couro	detecção (1)
119	couro	detecção (5)
123	couro	detecção (1)

Se considerarmos o número total de amostras analisadas, STEC foi isolada por meio da enumeração em apenas 0,2% (1/481) delas, enquanto que por meio da detecção, utilizando a separação imunomagnética, foi possível isolar o microrganismo em 4,8% (23/481) das amostras. Dado similar ao encontrado nesta pesquisa é relatado por Van Donkersgoed *et al.* (1999) que detectaram a prevalência de *E. coli* O157:H7 em 7,5% (93/1247) das amostras analisadas por meio da separação imunomagnética, provenientes de fezes e de rumem de gado de corte, enquanto que por cultura direta em TC-SMAC foi possível detectar o sorotipo em apenas 2,6% (33/1247) das amostras.

Echeverry *et al.* (2006) também relatam a enumeração como um método de baixa sensibilidade quando comparado com a detecção por meio da separação imunomagnética. Os pesquisadores testaram a sobrevivência de *E.*

coli O157:H7 sob diferentes condições de temperatura e observaram que em uma das temperaturas testadas (23°C) só foi possível a detecção do patógeno por meio da separação imunomagnética.

No entanto, a comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa com os obtidos por outros pesquisadores torna-se difícil, pois as metodologias empregadas para enumeração e detecção não são as mesmas empregadas neste trabalho.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e da discussão aqui apresentada, é possível concluir que:

• Nenhuma das cepas isoladas, quer seja do couro quer seja da meia-carcaça, apresentou o gene que codifica para a toxina Stx1.

• O teste para produção de entero-hemolisina não se mostrou um marcador epidemiológico eficiente na pesquisa de *E. coli* O157:H7 pois, apesar de possuírem o gene *ehxA*, apenas uma cepa deste sorotipo apresentou a produção desta hemolisina.

• O gene *uidA* não mostrou ser um bom marcador para a presença do sorotipo O157:H7 de *E. coli*, pois várias cepas que o apresentaram não aglutinaram com o soro específico.

• A metodologia empregada para a enumeração de STEC não apresentou a mesma sensibilidade que a utilizada para detecção.

• A presença de cepas de *E. coli* O157:H7 apresentando os genes stx_2, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*, mesmo que apenas no couro dos animais, é preocupante, pois falhas nas boas práticas de higiene no abatedouro podem levar à contaminação da carcaça do animal e até mesmo do produto final.

• A presença de cepa de *E. coli* portadora do gene stx_2 em meia-carcaça representa um risco à saúde pública, pois pode vir a contaminar o produto final e, se ativado, causar doenças.

• Apesar da baixa ocorrência entre os animais, o sorotipo e perfil genético das cepas de *E. coli* isoladas os tornam uma fonte potencial de infecções para o homem, o que alerta para a necessidade de vigilância da presença destes microrganismos que são capazes de sobreviver em condições desfavoráveis e que podem colocar em risco a saúde do consumidor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <http://www.abiec.com.br>. Acesso em 02 fev. 2009.

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 África. **Food Microbiol**. v. 26, p. 173-176, 2009.

ADWAN, G. M.; ADWAN, K. M. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. **Inter. J. Food Microbiol**. v. 97, n. 81- 84, 2004.

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

ALAM, M. J.; ZUREK, L. Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle feces. **J. Food Protect**. v. 69, n. 12, p. 3018-3020, 2006.

AL-GALLAS, N.; BENAISSA, R. R.; ANNABI, T. A.; BAHRI, O.; BOUDABOUS, A. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. **Food Microbiol**. v. 19, n. 3, p. 389-398, 2002.

ALONSO, S.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; FERREIRO, M. T.; LÓPEZ, C.; ALBERGHINI, L.; ALBONETTI, S.; ECHEITA, A.; TREVISANI, M.; BLANCO, J. Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. **Int. Microbiol**. v 10, p. 109-116, 2007.

AMERICAN SCIENTIST. Disponível em: <http://www.americanscientist.org/issues/id.788,y.0,no.,content.true,page.1,css.print/issue.aspx>. Acesso em 08 set. 2009.

ARTHUR, T. M.; BARKOCY-GALLAGHER, G.; RIVERA-BETANCOURT, A. M.; KOOHMARAIE M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. **Applied and Environ. Microbiol**., v. 68, n. 10, p. 4847-4852, 2002.

ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J.; NOU, X.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KENT, M. P.; JARONI, D.; PAULING, B.; ALLEN, D. M.; KOOHMARAIE, M. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. **J. Food Protect**. v. 67, n. 4, p. 658-665, 2004.

ATEBA, C. N.; MBEWE, M.; BEZUIDENHOUT, C. C. Prevalence of *Escherichia coli* O157 strains in cattle, pigs and humans in North West province, South Africa. **South African Journal of Science**. v. 104, n. 1-2, p.7-8, 2008.

BALAGUÉ, C.; KHAN, A. A.; FERNANDEZ, L.; REDOL, A. L.; AQUILI, V.; VOLTATTORNI, P.; HOFER, C.; EBNER, G.; DUENÃS, S.; CERNIGLIA, C. E. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. **Food Microbiol**. v. 23, p. 307-313, 2006.

BARHAM, A. R.; BARHAM, B. L.; JOHNSON, A. K.; ALLEN, D. M.; BLANTON, J. R.; MILLER, M. F. Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **J. Food Protect**. v. 65, n. 2, p. 280-283, 2002.

BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; ARTHUR, T. M.; RIVERA-BETANCOURT, M.; NOU, X., SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli,* including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. **J. Food Protect**. v. 66, n. 11, p. 1978-1986, 2003.

BASTOS, F. C.; 1, VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 265, p. 89-97, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American J. Clinical Pathol**. v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BENTANCOR, A.; RUMI, M. V.; GENTILINI, M. V.; SARDOY, C.; IRINO, K.; AGOSTINI, A.; CATALDI, A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 267, p.251-256, 2007.

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 J. Microbiol**. v. 38, p. 553-556, 2007.

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

BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; ALEKSIC, S.; GILLESPIE, H. A.; WHITTAM, T. S. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. Applied and Environ. Microbiol. v. 63, n. 6, p. 2175-2180, 1997.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAULFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens**: mecanisms and pathogenesis. New York: Springer Science, p. 181-200, 2008.

BIELASZEWSKA, M.; STOEWE, F.; FRUTH, A.; ZHANG, W.; PRAGER, R.; BROCKMEYER, J.; MELLMANN, A.; KARCH, H.; FRIEDRICH, A. W.. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. **J. Clinical Microbiol**. v. 47, n. 7, p. 2061-2066, 2009.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; DAHBI, G.; COIRA, M. A.; BLANCO, J. 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. **J. Clinical Microbiol**. v. 42, n. 1, p. 311-319, 2004.

BLANCO, M.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, G. D. J.; STEPHAN, R. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae*-η2). **BMC Microbiology**. v. 5, n. 23, p. 1-11, 2005.

BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **J. Clinical Microbiol**. v. 37, n. 31, p. 497-503, 1999.

BOUVET, J.; MONTET, M. P.; ROSSEL, R.; LE ROUX, A.; BAVAI, C.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; ATRACHE, V.; VERNOZY-ROZAND, C. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in French pork. **J. Applied Microbiol**. v.93, p. 7-14, 2002.

CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T.; CAUDURO, P. F.; DIAS, C. A. G. ; MEZZARI, A.; BRODT, T. Isolation of Shiga toxin-producing Esch*erichia coli* (STEC) serotype O91:H21from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. **Brazilian J. Microbiol**. v. 31, p. 266-270, 2000.

CARNEY, E.; O'BRIEN, S. B.; SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S.; DUFFY, G. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. **Food Microbiol**. v. 23, p. 52-59, 2006.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; CASTRO, A. F. P.; LEOMIL, L.; GUTH B. E. C. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 259, p. 234-239, 2006.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; SANTOS, L. F.; IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; BERGAMINI, A. M. M.; GUTH, B. E. C. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 274, p. 329-334, 2007.

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

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

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm>. Acesso em 01 mar. 2007.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em 01 ago. 2009.

COBBOLD, R.N.; DESMARCHELIER, P.M. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. **Vet. Microbiol**. v. 71, p. 125-137, 2000.

COBBOLD, R. N; DESMARCHELIER, P. M. Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. **Vet. Microbiol**. v. 79, p. 323-335, 2001.

COOKSON, A. L.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G. T. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environ. Microbiol**. v. 73, n. 20, p. 6360-6369, 2007.

DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KLASSEN, G.; IRINO, K.; UN RIGO, L.; STEFFENS, M. B. R.; FILHO, O. B.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. A prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Paraná State, Brazil. **Lett. Applied Microbiol**. v. 48, p. 645-647, 2009.

DOYLE, M. P.; PADHYE, V. V. *Escherichia coli*. In Doyle M. P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York, Marcel Dekker, p. 235-281, 1989.

ECHEVERRY, A.; LONERAGAN, G. H.; BRASHEARS, M. M. Survival of E*scherichia coli* O157:H7 in bovine feces over time under various temperature conditions. **J. Food Protect**. v. 69, n. 12, p. 2851-2855, 2006.

EFSA - The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. **The EFSA Journal**, 2006.

ELDER, R. O.; KEEN, J. E.; SIRAGUSA, G. R.; BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W. W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **PNAS**. v. 97, n. 7, p. 2999-3003, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa – Gado de Corte: Engorda de bovinos em confinamento – Aspectos gerais. Disponível em: <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc64/>. Acesso em 09 Set. 2009.

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

FARAH, S. M. S. S., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., IRINO, K., SILVA, L. R., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., PIGATTO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. Lett. Applied Microbiol. v. 44 p. 607-612 2007.

FENG, P. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 by DNA probe specific for an allele of *uidA* gene. **Molecular and Cellular Probes**. v. 7, p. 151-154, 1993.

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.

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 Microbiol**. v. 9, n. 5, p. 214-218, 2001.

GENTRY, M. K.; DALRYMPLE, J. M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. **J. Clin. Microbiol**. v. 12, p. 361-366, 1980.

GILBERT, R. A.; TOMKINS, N.; PADMANABHA, J.; J GOUGH, M.; KRAUSE,. O.; MCSWEENEY, C. S. Effect of finishing diets on *Escherichia coli* populations and prevalence of enterohaemorrhagic *E. coli* virulence genes in cattle faeces. **J. Applied Microbiol**. v. 99, p. 885-894, 2005.

GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R. IN: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, p. 271-309, 2008.

GUTH, B. E. C.; SOUZA, R. L.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infect. Dis.** v. 8, n. 5, 2002a.

GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 8, p. 1085-1089, 2002b.

GUTH, B. E. C.; RAMOS, R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo**. v. 97, n. 8, p. 1085-1089, 2002c.

GUTH, B.E.C., VAZ, T.M.I., GOMES, T.A.T., CHINARELLI, S.H., ROCHA, M.M.M., PESTANA DE CASTRO,A.F., IRINO, K. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. J. Medical Microbiol. v. 54, p. 805-806, 2005.

GUTH, B. E. C. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p. 271-309, 2008.

HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J.; GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can. J. Vet. Res**. v. 59, p. 265-270, 1995.

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

HOLT, J. G. **Bergey´s manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 751, 1994.

HUSSEIN, H. S. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **J. Anim. Sci**. 2007. Disponível em: <http://jas.fass.org/cgi/content/full/85/13_suppl/E63#BIBL>. Acesso em 07 ago. 2009.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M. A. M. F., NAVES, Z. V. F.; LARA, R. R.; MARCO, M. E. C.; ROCHA, M. M. M.; MOREIRA, T. P.; GOMES, T. A. T.; GUTH, B. E. C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, v. 8, n. 4, 2002.

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

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; MEDEIROS, M. I. C.; KATO, M. A. M. F.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. **J. Medical Microbiol**. v. 56, p. 565-567, 2007.

ISO 16654:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7.

JINNEMAN, K. C.; WEAGANT, S. D.; JOHNSON, J. M.; ABBOTT, S. L.; HILL, W. E.; TENG, B. J.; DANG, N.; RAMSDEN, R.; OMIECINSKI, C. J. A large insertion in the Shiga-like toxin 2 gene (*stx*) of an *Escherichia coli* O157:H7 clinical isolate. **Inter. J. Food Microbiol**. v. 57, p. 115-124, 2000.

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

KAPER, J. B. Pathogenic *Escherichia coli*. **Inter. J. Medical Microbiol**. v. 295, p. 355-356, 2005.

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

KHAN, A.; DAS, S. C.; RAMAMURTHY, T.; SIKDAR, A.; KHANAM, J.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; NAIR, G. B. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. **J. Clinical Microbiol**. v. 40, n. 6, p. 2009-2015, 2002.

KODAMA, T.; NAGAYAMA, K.; YAMADA, K.; OHBA, Y.; AKEDA, Y.; HONDA, T. Induction of apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* verocytotoxin 1 in vitro. **Med. Microbiol. Immunol**. v. 188, p. 73-78, 1999.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiol. Rev**. v. 24, p. 107-117, 2000.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol**. v. 97, 103-109, 2003.

LEUNG, P. H. M.; YAM, W. C.; NG, W. W. S.; PEIRIS, J. S.M. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. **Epidemiol. Infect**. v. 126, p. 173-179, 2001.

MENG, J., S. ZHAO, M. P. DOYLE, AND S. W. JOSEPH. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. **J. Food Prot**. v. 61, p. 1511-1514, 1998.

MENG, J., DOYLE, M. P.; ZHAO, T. ZHAO, S. In Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. **Food Microbiol.**: fundamental and frontiers. 3. ed. Washington, D. C.: ASM Press, p. 249-269, 2007.

MONDAY, S. R.; WHITTAM, T. S.; FENG, P. C. H. Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of β-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. **The J. Infect. Dis**. v. 184, p. 918-921, 2001.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHAL, J. B., ALEIXO, J. A. G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol**. v. 93, p. 179-183, 2003.

NASTASIJEVIC, I.; MITROVIC, R.; BUNCIC, S. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. **Meat Science**. v. 82, n. 1, p. 101-105, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 6th ed. Villanova, PA: NCCLS, 2004.

OLIVEIRA, M. G.; BRITO, J. R. F.; GOMES, T. A. T.; GUTH, B. E. C.; VIEIRA, M. A. M., NAVES, Z. V. F. VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **Int. J. Food Microbiol**., v. 127, p. 139-146, 2008.

OSTROFF, S. M.; TARR, P.L.; NEIL, M. A.; LEWIS, J. H.; HARGRETT-BEAN, N.; KOBAYASHI, J. M. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections. **J. Infect. Dis**. v. 160, p. 994-998, 1989.

ORDEN, J.A.; CID, D.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; GARCÍA, S.; MARTÍNEZ, S.; FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. **J. Applied Microbiol**. v. 93, p. 29-35, 2002.

PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. S.; ETCHEVERRIA, A. I.; ARROYO, G. H.; USERA, M. A.; PARMA, A. E. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. **Vet. Microbiol**. v. 100, p. 3-9, 2004.

PATON, J. C; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PIGATTO, C. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; COMARELLA, L.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; FARAH, S. M. S. S.; WARTH, J. F.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. **Can. J. Microbiol**. v. 54, p. 588-593, 2008.

PILIPCINEC, E.; TKACIKOVA, L.; NAAS, H.T.; CABADAJ, R.; MIKULA, I. Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. **Folia Microbiol**. (Praha), v. 44, p. 455-456, 1999.

PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; CHAMPS, C.; PALCOUX, J.; REYNAUD, A.; SCHEUTZ, F.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. **J. Clinical Microbiol.** v. 38, n. 3, p. 1023-1031, 2000.

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 Infect. Dis**. v. 11, n. 4, p. 603-609, 2005.

REICKS, A. L.; BRASHEARS, M. M.; ADAMS, K. D.; BROOKS, J. C.; BLANTON, J. R.; MILLER, M. F. Impact of transportation of feedlot cattle to the harvest facility on the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and total aerobic microorganisms on hides. **J. Food Protect**. v. 70, n. 1, p. 17-21, 2007.

RIGOBELO, 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. **Int. J. Food Microbiol**. v. 110, p. 194-198, 2006a.

RIGOBELO, 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.58, n.3, p.305-310, 2006b.

RIGOBELO, 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 Pathog**. Dis. v. 5, n. 6, p. 811-817, 2008.

ROGERIE, F.; MARECAT, A.; GAMBADE, S.; DUPOND, F.; BEAUBOIS, P.; LANGE, M. Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. **Internat. J. Food Microbiol**. v. 63, p. 217-223, 2001.

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

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F., LEITE, D.D. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Braz. J. Microbiol**. v. 34, n. 3, p. 230-235, 2003.

SANDRINI, C. N. M.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Verotoxin-producing *Escherichia coli*: isolation and prevalence in 60 dairy cattle farms from Pelotas-RS, Brazil. Ciência Rural. v. 37, n.1, p.175-182, 2007.

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.

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

SCOTT, L.; MCGEE, P.; WALSH, C.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; BLANCO, J.; KARCZMARCZYK, M.; EARLEY, B.; LEONARD, N.; SHERIDAN, J. J. Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. **Vet. Microbiol**. v. 134, p. 288-293, 2009.

SOUZA, R. L.; NISHIMURA, L. S.; GUTH, B.E.C. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165: HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. **Diag. Microbiol. Infect. Dis**. v. 59, p. 223-225, 2007.

SPERANDIO, V.; KAPER, J. B.; BORTOLINI, M. R.; NEVES, B. C.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 164, p. 133-139, 1998.

TIMM, C.D.; IRINO, K.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. M.; GUTH, B. E. C.; VAZ, T. M. I.; MOREIRA, C. N.; ALEIXO, J. A. G. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Lett. Applied Microbiol**. v. 44, p. 419-425, 2007.

TOLEDO, M. R.; FONTES, C.F; TRABULSI, L. R. EPM - modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H_2S, urease e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.**, 13(4): 309-315, 1982a.

TOLEDO, M. R.; FONTES, C.F; TRABULSI, L. R. MILi - um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.**, 13(3): 230-235, 1982b.

TSAI, H. M. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatmente of thrombotic thrombocytopenic purpura. **J. Amer. Soc. Nephrol**. v. 14, n. 4, p. 1072-1081, 2003.

TZIPORI, S.; SHEORAN, A.; AKIYOSHI, D.; DONOHUE-ROLFE, A.; TRACHTMAN, H. Antibody therapy in the management of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 17, n. 4, p. 926-941, 2004.

VAN DONKERSGOED, J.; GRAHAM, T.; GANNON, V. The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* 0157:H7, and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing. **Can. Vet. J.** v. 40, p. 332-338, 1999.

VARELA-HERNÁNDEZ, J. J.; CABRERA-DIAZ, E.; CARDONA-LÓPEZ, M. A.; IBARRA-VELÁZQUEZ, L. M.; RANGEL-VILLALOBOS, H.; CASTILLO, A.; TORRES-VITELA, M. R.; RAMÍREZ-ÁLVAREZ, A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. **Internat. J. Food Microbiol**. v. 113, p. 237-241, 2007.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, A. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clinical Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 903-905, 2004.

VICENTE, H. I. G.; AMARAL, L. A.; CERQUEIRA, A. M. F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, Water and Milk samples from dairy farms. **Brazilian J. Microbiol**. v. 36, p. 217-222, 2005.

VON LAER, A. E. Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas carcaças dos animais abatidos. Universidade de São Paulo, 2009. Tese de Doutorado.

WATANABE, Y.; OZASA, K.; MERMIN, J. H.; GRIFFIN, P. M.; MASUDA, K.; IMASHUKU, S.; SAWADA, T. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. **Emerging Infect. Dis**. v. 5, n. 3, 1999.

WEIFEL, C.; SCHUMACHER, S.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; TASARA, T., BLANCO, J.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. **Vet. Microbiol**. v. 105, p. 37-45, 2005.

WOERNER, D. R.; RANSOM, J. R.; SOFOS, J. N.; DEWELL, G. A.; SMITH, G. C.; SALMAN, M. D.; BELK, K. E. Determining the prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and beef from the feedlot to the cooler. **J. Food Protect.**, v. 69, n. 12, p. 2824-2827, 2006.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, A. W.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. **Applied and Environ. Microbiol**. v. 71, n. 1, p. 558-561 2005.

ZHAO, S.; WHITE, D. G.; GE, B.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; WAGNER, D.; GAINES, S.; MENG, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environ. Microbiol**. v. 67, n. 4, p. 1558-1564, 2001.

ZSCHÖECK, M.; HAMANN, H.P.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. **Letters in Applied Microbiol**. v. 31, p. 203-208, 2000.

ANEXO A

Composição da solução tampão – 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 ($g.L^{-1}$) tampão fosfato salina – pH 7,3

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

O tampão foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

ANEXO C

Composição ($g.L^{-1}$) do caldo Penassay – pH 7,0

- Extrato de carne	1,5
- Extrato de levedura	1,5
- Peptona	5,0
- Dextrose	1,0
- Cloreto de sódio	3,5
- Fosfato dipotássio	3,68
- Fosfato monopotássio	1,32

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.