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

Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina
de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes
refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da
Grande São Paulo

Priscila Pedullo Alvares

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dra. Mariza Landgraf

São Paulo
2011

Priscila Pedullo Alvares

Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina
de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes
refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da
Grande São Paulo

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dra. Mariza Landgraf

São Paulo

2011

Priscila Pedullo Alvares

Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina
de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes
refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da
Grande São Paulo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª Dra. Mariza Landgraf
orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de 2011.

*Aos meus pais, Márcia e Roberto,
com muito amor, por todo apoio e
incentivo, não só na realização
deste trabalho, mas em vários
momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Mariza Landgraf pela orientação, paciência e ensinamentos.

À Profª Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pelo convívio e ajuda.

À Profª Dra. Maria Teresa Destro pelas sugestões e ensinamentos transmitidos.

À Profª Dra. Beatriz E.C. Guth pela imensa ajuda e ensinamentos na realização do teste de citotoxicidade em células Vero.

À Dra. Tânia Maria Ibelli Vaz do Instituto Adolfo Lutz pela sua contribuição na sorotipificação.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza do Instituto Butantan pela disponibilização de cepas padrão.

Aos meus pais, Roberto e Márcia, que sempre acreditaram em mim. Obrigada pelo amor, carinho, confiança e apoio que sempre me deram.

Ao meu irmão Thiago “Cabeça”, pela união, ajuda e amizade em todos momentos.

Às minhas queridas avós Zelinda, pelo amor e velinhas acendidas e Mafalda, pelo amor e pelas bençãos.

Ao meu namorado Luiz por todo amor, incentivo, paciência, dedicação e companherismo sempre que precisei.

Às amigas-irmãs Bia, Carol e Jan pela amizade verdadeira, conselhos, ajuda e momentos inesquecíveis.

Ao Matheus pelas imensas ajudas (que não foram poucas), ensinamentos, conselhos e, acima de tudo, amizade verdadeira.

Aos amigos que ganhei e sempre levarei comigo, Crys, Verônica, Adriana, Graci e Anderson por toda ajuda, amizade e momentos de alegria que passamos.

Aos amigos do laboratório Kátia, Lúcia, Verena, Maria Fernanda, Carol, Priscila, Eb, Vanessa, Slav e Vinícius pela amizade, colaboração e ensinamentos.

À Kathelin pelas conversas e ajuda sempre que precisei.

À Mônica, Cleonice e Edílson da secretaria do departamento pelos serviços prestados.

À Elaine e Jorge da secretaria de Pós-Graduação pela atenção dedicada e serviços prestados.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À todas as pessoas que, de qualquer forma, contribuíram e colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!

RESUMO

ALVARES, P.P. **Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da Grande São Paulo.** 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Escherichia coli produtoras de toxina de Shiga (STEC) são patógenos veiculados por alimentos capazes de causar desde diarreia branda até severa e sanguinolenta e evoluir para complicações graves como colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica e púrpura trombótica trombocitopênica. Esses microrganismos têm sido associados a numerosos surtos e vários casos esporádicos de infecções em todo o mundo devido ao consumo de alimentos contaminados. O sorogrupo O157 desse grupo de microrganismos é considerado o principal devido ao seu envolvimento em surtos de doença por STEC, entretanto, muitos casos vêm ocorrendo em todo o mundo devido a cepas patogênicas de STEC não-O157, como O26, O103, O111 e O145. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a ocorrência de STEC em três pontos da linha de abate de bovinos destinados à exportação e em cortes refrigerados de aves e de bovinos comercializados na região da Grande São Paulo; pesquisar a presença dos fatores de virulência dos isolados através dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *ehxA*; identificar isolados de *E. coli* O157:H7 pela pesquisa dos genes *uidA*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}; verificar a citotoxicidade em células Vero; pesquisar a atividade enterohemolítica dos isolados; avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos; identificar os sorotipos e avaliar a diversidade genética dos isolados de STEC obtidos. Na linha de abate, 201 animais foram amostrados, obtendo-se 603 amostras que compreenderam 201 amostras provenientes do couro, 201 de carcaça e 201 de meia carcaça. No varejo, foram analisadas 100 amostras de cortes de carne bovina e 100 de cortes de frango. A metodologia utilizada para detecção de *E. coli* sorogrupo O157 foi a preconizada pela ISO 16654, enquanto para os sorogrupos O26, O103, O111 e O145 foi empregada a metodologia descrita pelo “Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals” (NRM 006). Os isolados obtidos foram confirmados como STEC pela técnica de PCR. Dos 201 animais amostrados, dois (1,0%) foram positivos para STEC, obtendo-se sete isolados (três do animal número 399 e quatro do animal 401) do couro. Não houve o isolamento do microrganismo nas amostras de carcaça e meia carcaça. Os sete isolados apresentaram o perfil *stx*₂, *uidA*, *eaeA*, *ehxA*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7} podendo, assim, ser considerados *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) pertencentes ao sorotipo O157:H7. Na avaliação da atividade enterohemolítica, nenhum dos isolados expressou essa proteína e, com relação ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, três (42,8%) isolados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e um (14,3%) ao cloranfenicol. O PFGE revelou que as sete cepas de STEC isoladas apresentaram dois perfis genéticos distintos, com similaridade entre eles de 75,3%. STEC não foi detectada nas amostras de carne bovina e de aves comercializadas no varejo. Estes resultados sugerem que, apesar de presente no couro dos animais, o emprego de medidas sanitárias eficientes ao longo da cadeia de produção da carne bovina até sua comercialização na forma de corte, contribui para que o isolamento de STEC nas etapas posteriores seja raro.

ABSTRACT

ALVARES, P.P. **Occurrence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during cattle slaughter for exporting and refrigerated beef and poultry cuts commercialized in the Metropolitan area of Sao Paulo.** 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens that can cause since mild or severe and bloody diarrhea to serious complications, such as hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. These microorganisms have been associated with numerous outbreaks and several sporadic cases worldwide due to consumption of contaminated food, especially meat. *E. coli* O157 is considered the main serogroup involved in disease outbreaks of STEC, however, many cases have been occurred worldwide due to non-O157, such as O26, O103, O111 and O145 strains. The aims of the present study were to determine the occurrence of STEC at three points of cattle slaughter for exporting and in refrigerated beef and poultry cuts commercialized in the Metropolitan area of Sao Paulo, Brazil; identify the genes that code for the virulence factors *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *ehxA*; detect *E. coli* O157:H7 strains using *uidA*, *rfb*_{O157} and *fliC*_{H7} genes; verify the cytotoxicity in Vero cells and the enterohemolytic activity; evaluate the antimicrobial susceptibility profile; identify the STEC serotypes and evaluate the genetic diversity of STEC isolates. A total of 603 samples were collected from 201 animals at slaughter. The samples were taken from hide (201), carcass (201) and half-carcass (201) and were always collected from the breast region. At retail, 100 refrigerated beef cuts and 100 chicken cuts were analyzed. The detection of *E. coli* O157 samples were conducted according to the ISO methodology (16654) and for detection of O26, O103, O111 e O145 serogroups the Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals methodology (NRM 006) was used. The isolates were confirmed as STEC by PCR technique. Among 201 animals sampled, two (1,0%) were positive for STEC, obtaining seven isolates from hide (three from animal number 399 and four from animal number 401). The microorganism was not detect in carcass and half carcass samples. The seven isolates carried *stx*₂, *uidA*, *eaeA*, *ehxA*, *rfb*_{O157} and *fliC*_{H7} genes, so, they can be considered as enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 serotype. None of the isolates produced the enterohemolytic activity and three (42,8%) isolates showed resistance to nalidixic acid and one (14,3%) to chloramphenicol. PFGE revealed that the seven STEC strains showed two distinct genetic profiles, with 75.3% of similarity between them. STEC was not detected from beef and poultry cuts commercialized at retail. These results suggest that, although present in animals hides, the STEC isolation at later stages of food chain was rare, probably due to effective sanitary measures to control contamination and transmission of this pathogen along the beef production chain until commercialization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Exemplos de surtos causados por STEC entre 2000 e 2010.	05
Tabela 02.	“Primers” utilizados na realização da PCR para <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>uidA</i> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> (Feng e Monday, 2000), “ <i>rfb</i> _{O157} (Paton e Paton, 1998b) e <i>fliC</i> _{H7} (Gannon et al., 1997).	34
Tabela 03.	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC) do sorotipo O157:H7 em amostras de couro, carcaça e meia carcaça de bovinos destinados à exportação para a União Européia.	42
Tabela 04.	Características dos isolados positivos para STEC obtidos de dois animais.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Microvilosidades intestinais intactas (1) e lesão “attaching/effacing” no microscópio eletrônico (15.680x) (2). (a) Desaparecimento das microvilosidades do enterócito, (b) adesão íntima da bactéria ao enterócito, (c) estrutura em pedestal e (d) internalização da bactéria. Fonte: Mainil e Daube (2005).	11
Figura 02.	Fluxograma do processo de abate de bovinos com indicações dos pontos de coleta.	25
Figura 03.	Carcças bovinas com indicação das regiões onde amostras superficiais de 400 cm ² foram coletadas.	26
Figura 04.	Representação esquemática da metodologia ISO 16654 empregada para detecção de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga sorogrupo O157 em amostras de couro, carcaça, cortes de bovinos e de frangos.	30
Figura 05.	Representação esquemática da metodologia SGDIA NRM 006 empregada para detecção de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga sorogrupos O26, O103, O111 e O145 em amostras de cortes bovinos e de frangos.	31
Figura 06.	Representação esquemática do processo de separação imunomagnética.	32

- Figura 07. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *uidA* realizada para amostras de STEC segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (1 Kb); A1 e A2: amostras 44
positivas para *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *uidA*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.
- Figura 08. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *ehxA* realizada para amostras de STEC segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso 44
molecular (1 Kb); A1 e A2: amostras positivas para *ehxA*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.
- Figura 09. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *flic*_{H7} e *rfb*_{O157} realizada para amostras de STEC segundo Cobbaut et al. (2009). M: marcador de peso 45
molecular (1 Kb); A1, A2, A3 e A4: amostras positivas para *flic*_{H7} e *rfb*_{O157}; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.
- Figura 10. Perfil do efeito citotóxico em células Vero das cepas de STEC em 24, 48 e 72 h de incubação a 37° C em estufa de 60
CO₂ (5%).
- Figura 11. Perfil de suscetibilidade das cepas de STEC obtidos frente 63
a diferentes antimicrobianos.
- Figura 12. Representação da relação genética entre os dois perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição XbaI a partir de 65
sete cepas de STEC isoladas neste estudo.

LISTA DE ANEXOS

Solução tampão – pH 7,4	85
Solução fosfato salina tamponada – pH 7,3	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
1.2 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC).....	6
1.3 Fatores de patogenicidade de STEC.....	8
1.4 Infecções causadas por STEC.....	12
1.5 Gado bovino como reservatório de STEC.....	14
1.6 Aves como reservatório de STEC.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Cepas de microrganismos.....	23
3.1.2 Coleta das amostras no abate de bovinos.....	22
3.1.3 Coleta das amostras de bovinos e de aves.....	26
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Preparo das amostras de couro, carcaças bovinas, cortes bovinos e cortes de frangos.....	27
3.2.2 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (ISO - “International Organization for Standardization” 16654 e SGDI - “Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals” NRM 006).....	28
3.2.3 Pesquisa das seqüências genéticas para <i>stx</i> ₁ e <i>stx</i> ₂ , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>uidA</i> , <i>rfb</i> _{O157} e <i>fliC</i> _{H7}	33
3.2.3.1 Preparo do DNA.....	33
3.2.3.2 Reação de Polimerização em cadeia (PCR).....	33

3.2.3.3 Análise do produto amplificado.....	35
3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica em células Vero (Gentry e Dalrymple, 1980).....	35
3.2.4.1 Preparo do sobrenadante das culturas de <i>E.coli</i>	35
3.2.4.2 Teste de citotoxicidade.....	36
3.2.5 Pesquisa de atividade enterohemolítica (Beutin et al.,1989).....	36
3.2.6 Avaliação da sensibilidade antimicrobiana (Bauer et al., 1966).....	37
3.2.7 Determinação dos sorotipos.....	38
3.2.8 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	38
3.2.8.1 Suspensão celular	38
3.2.8.2 Preparo dos blocos de agarose.....	39
3.2.8.3 Lise celular e lavagens.....	39
3.2.8.4 Restrição.....	40
3.2.8.5 Eletroforese.....	40
3.2.8.6 Análise dos resultados.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Ocorrência de <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga no couro, carcaça e meia carcaça bovina.....	42
4.2 Ocorrência de <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga em cortes refrigerados de carne bovina.....	52
4.3 Ocorrência de <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga em cortes refrigerados de frango.....	55
4.4 Citotoxicidade em células Vero.....	58
4.5 Pesquisa da atividade enterohemolítica.....	60
4.6 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana.....	62
4.7 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	63
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

A importância das questões sanitárias nas transações comerciais entre os países envolvendo alimentos é crescente. Uma das dificuldades que se têm verificado na produção e comercialização de produtos agropecuários relaciona-se justamente com as questões de natureza sanitária. O atendimento às exigências do consumidor já não está mais relacionado somente à eficiência econômica e à redução de custos. A concorrência pelos mercados externos de produtos e serviços está cada vez mais relacionada a fatores extra-preço, como qualidade e inocuidade do produto, incluindo embalagem, classificação e o atendimento às especificações sanitárias/fitossanitárias. Por sua vez, a qualidade de um produto é resultado de um processo de controle dos fatores de produção e comercialização, desde a escolha e aquisição de insumos a serem empregados na sua produção até o momento em que chega às mãos do consumidor (IEA, 2007).

O setor carnes é a área de maior destaque do agronegócio brasileiro, tornando o país o principal produtor e exportador de proteína de origem animal. Em 2009, o Brasil produziu cerca de 9,5 mi de toneladas de carne bovina, tornando-se o segundo maior produtor mundial, atrás somente dos Estados Unidos, com 12 mi de toneladas. No que se refere ao consumo mundial de carne bovina, nosso país ocupa o segundo lugar com cerca de 7,5 mi de toneladas/ano, gerando um consumo per capita de 37,4 kg/pessoa/ano, o que faz da bovinocultura de corte a maior representante do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano e oferecendo cerca de 7,5 mi de empregos (ABIEC, 2010).

Com relação às exportações, em 2009 o Brasil liderou o ranking dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de 2,2 mi de toneladas equivalente à carcaça e receita cambial de US\$ 5,3 bilhões. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países. De acordo com o acompanhamento da Secex (Secretaria de Comércio Exterior), as exportações de carnes alcançaram US\$ 4,1 mi entre os meses de janeiro e dezembro de 2009. Entre os produtos

mais exportados está a carne bovina “in natura” com 75% seguida da carne bovina industrializada com 13% do total (ABIEC, 2010).

No que concerne à carne de frango, por ser mais econômica entre as proteínas de origem animal, a produção e o consumo têm aumentado consideravelmente. A produção brasileira em 2009 foi de 10,9 mi de toneladas, resultado que manteve o país no segundo lugar entre os maiores produtores mundiais, atrás somente dos Estados Unidos, com produção de 16,48 mi de toneladas. Com relação ao consumo mundial de carne de frango, o Brasil ocupa o quarto lugar, com consumo per capita de 38,9 Kg/pessoa/ano, atrás de Estados Unidos, China e União Européia (ABEF, 2010).

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), o Brasil é líder absoluto nas exportações mundiais de carne de frango desde 2004, exportando para mais de 100 países. Em 2008, as exportações de carne de frango totalizaram embarques de 3,6 mi de toneladas, o que corresponde a um crescimento de 11% em comparação com 2007. Entre os segmentos exportados, os cortes de frango totalizaram 997 mil toneladas seguido do frango inteiro com 648 mil toneladas (ABEF, 2010).

Os alimentos de origem animal são frequentemente envolvidos em enfermidades transmitidas por alimentos (ETA), fato que os coloca entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública (WHO, 2010).

Devido às características intrínsecas da carne, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade, que propiciam um ambiente favorável para a multiplicação de microrganismos, associada às diversas etapas às quais a carne é submetida desde o abate dos animais até sua comercialização, inúmeros patógenos já foram responsáveis por causar doenças associadas ao consumo deste alimento, destacando-se *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (ICMSF, 2005; Sofos, 2008).

Dentre estes microrganismos, as STEC são motivo de preocupação para a saúde pública devido à sua associação, não só com surtos, mas também com a síndrome hemolítica urêmica (SHU), considerada a principal causa de

insuficiência renal aguda em crianças (Karmali et al., 2010). De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), ocorrem anualmente nos Estados Unidos cerca de 73.000 casos de infecção com 3.000 hospitalizações e 90 mortes causadas por STEC. Na maioria dos surtos relatados, os alimentos de origem animal foram incriminados (CDC, 2010a).

1.1 *Escherichia coli*

E. coli, membro da família Enterobacteriaceae, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporogênicos, produtores de catalase mas não de oxidase, que podem apresentar motilidade por meio de flagelos peritríquios. Possuem de 1,1 a 1,5 μm x 2,0 a 6,0 μm , ocorrendo em pares ou isoladamente e sua temperatura ideal de multiplicação é de 37° C (Holt et al., 1994).

Este microrganismo é considerado um dos patógenos bacterianos mais versáteis. Enquanto algumas cepas são membros da microbiota de homens e animais, desempenhando um importante papel na fisiologia intestinal, outras possuem fatores de virulência que as capacitam a causar infecções no trato intestinal ou em outros locais, como no trato urinário e até mesmo meningite (Meng et al., 2007).

Por ser predominante na microbiota intestinal, *E. coli* é considerada, até o momento, o melhor indicador de contaminação de origem fecal em alimentos. Além de estar relacionada a práticas de higiene insatisfatórias, sua importância em alimentos é ainda mais evidente devido a presença de cepas patogênicas para o homem, que estiveram envolvidas, nos últimos anos, em surtos de doença transmitida por alimentos de grandes proporções (Meng et al., 2007).

Os sorotipos desta bactéria são definidos com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) e são designados por números arábicos, colocados em seguida a cada letra representativa do antígeno, como por exemplo: O26:K60:H11. Atualmente, são reconhecidos 179 Ag O, 53 Ag H e 103 Ag K. No entanto, nem todo isolado de *E. coli* expressa os três antígenos

ao mesmo tempo, pois uma parte pode ser rugosa, não possuindo o Ag O, e outra imóvel, não possuindo flagelos. Em consequência, a identificação sorológica de *E. coli* é muitas vezes incompleta, podendo se basear, nesses casos, apenas nos antígenos O ou H (Meng et al., 2007).

A patogenicidade de *E. coli* é um mecanismo multifatorial complexo, que envolve um grande número de fatores de virulência, como toxinas e adesinas, codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas. Dessa maneira, esses genes podem ser transmitidos entre as cepas resultando em novas combinações de genes de virulência ou tornando uma *E. coli* não patogênica em patogênica (Kaper, 2005).

Com base nos fatores de virulência, mecanismos de ação, manifestações clínicas e epidemiologia, os subgrupos de *E. coli* considerados diarreiogênicos são, atualmente, agrupados em seis patótipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (Nataro e Kaper, 1998).

Entre esses grupos, pode ser considerado de maior importância na área de alimentos, o grupo das STEC, tendo em vista os inúmeros surtos causados, com diversos óbitos, como demonstra a Tabela 01.

Tabela 01. Surtos causados por STEC entre 2000 e 2010.

Ano	Localização	Nº de casos (mortes)	Casos de SHU	Veículo	Referência
2000	Inglaterra	4	-	leite não pasteurizado	Eurosurveillance, 2010
2003/2004	Dinamarca	25	-	leite	Eurosurveillance, 2010
2005	Holanda	21	-	produtos cárneos	Eurosurveillance, 2010
2005	Irlanda	18	-	interpessoal	Eurosurveillance, 2010
2006	EUA	199 (3)	31	espinafre	CDC, 2010b
2006	EUA	71	8	alface	CDC, 2010b
2007	Holanda/Islândia	50	-	alface	Eurosurveillance, 2010
2007	EUA	21	4	pizza congelada	CDC, 2010b
2007	EUA	40	2	carne de hambúrguer	CDC, 2010b
2007	Dinamarca	20	-	salsicha	Eurosurveillance, 2010
2008	EUA	49	1	carne moída	CDC, 2010b
2008/2009	Holanda	20	-	produtos cárneos	Eurosurveillance, 2010
2009	EUA	23	2	carne moída	CDC, 2010b
2009	EUA	72	10	massa de biscoito	CDC, 2010b
2009	EUA	26 (2)	5	carne moída	CDC, 2010b
2010	EUA	3	1	leite não pasteurizado	ProMED, 2010a
2010	EUA	26	3	alface	ProMED, 2010b

1.2 *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC)

Cepas de STEC compreendem todos os isolados de *E. coli* capazes de produzir toxinas citotóxicas semelhantes às sintetizadas por *Shigella dysenteriae*. Pelo fato de causarem efeito citopático em culturas de células Vero, STEC também são conhecidas como VTEC, ou seja, *E. coli* produtora de verotoxina (Karmali, 1989).

STEC são consideradas patógenos de origem alimentar, responsáveis por um amplo espectro de doenças humanas que varia de diarreias brandas até severas e sanguinolentas a complicações graves como colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT) (Meng et al., 2007).

Os ruminantes, em especial os bovinos e ovinos, são seus principais reservatórios. Sendo assim, a contaminação fecal dos alimentos representa a fonte habitual de infecção para humanos. A transmissão pessoa-pessoa também tem sido observada em surtos, visto que a dose infecciosa é aparentemente baixa (Paton e Paton, 1998a).

Desde 1982, quando o sorotipo O157:H7 foi pela primeira vez associado a enfermidades transmitidas por alimentos (ETA), através de um surto ocorrido nos Estados Unidos (Riley et al., 1983), mais de 100 surtos foram documentados com 52% tendo sido atribuídos ou relacionados a alimentos derivados de carne (Woerner et al., 2006). Embora o sorogrupo O157 seja atualmente o mais estudado, há mais de 100 sorogrupos de STEC implicados em doenças humanas, destacando-se os sorogrupos O26, O103, O111 e O145 que estão sendo cada vez mais isolados de surtos e casos clínicos (Perelle et al., 2007). Em alguns países, esses sorogrupos são mais frequentemente isolados de pacientes com diarreia e SHU do que cepas O157 (Caprioli et al., 1994; Huppertz et al., 1996; Vaz et al., 2004; Brooks et al., 2005; Guth et al., 2002, 2005; Johnson et al., 2006; Rivas et al., 2006; Souza et al. 2007; De Toni et al., 2009).

STEC é considerada um sério problema de saúde em muitos países desenvolvidos, entre eles Estados Unidos, Canadá, Japão e Reino Unido. Nos Estados Unidos, o sorotipo O157:H7 é a principal causa de CH e SHU em crianças (Echeverry et al., 2006). Entre os surtos ocasionados por STEC, o maior já relatado ocorreu no Japão em 1996, envolvendo mais de 10.000 casos (CDC, 2010b). Sorogrupos não-O157 são mais comuns na Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil (Guth, 2008).

Apesar de a 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, especialmente na Argentina (CDC, 2010a), onde SHU é endêmica e a taxa de incidência anual em crianças é estimada em 9,2 para cada 100.000, constituindo a primeira causa de insuficiência renal aguda em crianças e a segunda de insuficiência renal crônica (Balangué et al., 2006). Nesse país, STEC é responsável por 20% dos casos de transplante renal em crianças e adolescentes, e o principal sorotipo envolvido na SHU é o O26:H11. (Bentacor et al., 2007).

No Brasil, em 2002, Irino et al. relataram, pela primeira vez, a associação entre o sorotipo O157:H7 e doença em humanos ao analisarem cepas provenientes de três pacientes com diarreia severa à sanguinolenta no estado de São Paulo. Nesse mesmo ano, Guth et al. (2002) relataram o primeiro caso de SHU causado por STEC em um paciente de oito meses no nordeste do país, e o sorotipo identificado foi o O26:H11.

No entanto, as infecções humanas por STEC, em nosso país, são principalmente associadas a casos de diarreia não sanguinolenta, especialmente em crianças (Irino et al., 2002, 2007; Vaz et al., 2004; Guth et al., 2005). Vaz et al. (2004) e Cergole-Novella et al. (2006) relataram que a maioria das cepas de STEC isoladas de humanos pertenciam ao sorogrupo O111 e estavam relacionadas com casos de diarreia sem demais complicações.

1.3 Fatores de patogenicidade de STEC

STEC causa diarreia pela sua capacidade de aderir à membrana da célula do hospedeiro e colonizar o intestino grosso, produzindo uma ou mais toxinas (Chapman, 1995). Apesar disso, alguns fatores de virulência são bem conhecidos e caracterizados, como a toxina de Shiga 1 e 2, a intimina e a enterohemolisina (Nataro e Kaper, 1998).

Cepas de STEC produzem uma ou duas citotoxinas denominadas toxina de Shiga tipo 1 (Stx1) e tipo 2 (Stx2), das quais Stx2 é fator de virulência primário para SHU (Tzipori et al., 2004). Porém, cabe ressaltar que apesar da importância das Stx para a patogenicidade de STEC, nem todas as cepas produtoras destas toxinas são capazes de causar doenças, pois a patogenicidade é multifatorial (Coombes et al., 2008; Tarawneh et al., 2009).

Essas citotoxinas foram primeiramente descritas como verotoxinas (VTs) por Konowalchuk et al. (1977), uma vez que causam efeito citopático irreversível em culturas de células Vero, originárias de rim de macaco verde africano. Também são denominadas de toxinas “Shiga-like” (SLTs), já que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), causador da disenteria bacilar. São proteínas de alto peso molecular e sua produção é determinada por dois fagos lisogênicos distintos (Meng et al., 2007).

A toxina de Shiga é composta por uma subunidade A, que é a parte biologicamente ativa, e cinco subunidades B, que se ligam aos receptores celulares específicos (Karmali, 2010).

O modo geral de ação dessas toxinas envolve a adesão a um receptor glicolipídico na superfície da célula através das subunidades B e a internalização da subunidade A, que é enzimaticamente reduzida a um fragmento A1, responsável por remover um grupo adenina do RNA 28S, pertencente à fração 60S dos ribossomos dos enterócitos. Isto resulta na inibição da síntese protéica e interrupção do funcionamento celular, ocasionando a apoptose da célula. A especificidade de Stx nas células-alvo

depende da quantidade de receptores específicos presentes na membrana destas células. O receptor Gb3 (globotriaosilceramida), específico para Stx1 e Stx2, está presente nas células Vero e HeLa, tornando-as susceptíveis à atividade citotóxica de Stx (Kodama et al, 1999; Karmali, 2010).

Em humanos, após a colonização do intestino por células de STEC, as Stx são produzidas e atravessam a parede intestinal através de internalização pelas células do hospedeiro, atingindo a corrente sanguínea. Na circulação, o principal alvo são as células endoteliais de artérias de pequeno porte, dos rins, cérebro e mucosa gastrintestinal. As consequências são o extravasamento de fluídos e/ou hemorragias levando a lesões de tecido e síndromes clínicas (Pruimboom-Brees et al., 2000; Mainil e Daube, 2005).

No rim, essas toxinas causam dano renal crônico, levando à diálise e eventual necessidade de transplante em casos de SHU. A nefrotoxicidade é observada em 10% dos pacientes com infecção por STEC. Doenças neurológicas também podem ocorrer após a infecção ou como parte de sequelas causadas pela PTT, levando ao desenvolvimento de coágulos e consequentemente à morte do paciente (Duffy et al., 2001; Kaper, 2005).

Stx1 é antigenicamente mais parecida à toxina produzida por *S. dysenteriae* sorotipo 1, e constitui um grupo mais homogêneo, com apenas duas variantes: Stx1c e Stx1d, que se diferem ligeiramente em sua sequência de aminoácidos, sem consequências sobre sua antigenicidade e toxicidade celular. Por outro lado, Stx2 apresenta cinco variantes (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g) que diferem muito entre si em sua antigenicidade, toxicidade e sequências genéticas (Caprioli et al., 2005; Guth, 2008).

Estudos têm demonstrado uma maior patogenicidade de Stx2 em relação a Stx1, uma vez que há uma forte associação entre a presença de Stx2 e o desenvolvimento de SHU (Karmali, 2010).

Outro fator de virulência, a lesão A/E, “attaching and effacing” ou adesão íntima e destruição das microvilosidades, é uma lesão histológica específica do intestino causada por uma classe de cepas patogênicas, denominadas EPEC

(Karmali, 1989). Posteriormente, foi observado que cepas EHEC O157:H7 podem produzir uma lesão muito semelhante, estendendo a definição de EHEC para todas as cepas de *E. coli* produtoras de Stx e lesões A/E (Mainil e Daube, 2005)

Este tipo de lesão interrompe a função das células epiteliais e induz a uma lesão característica das microvilosidades. A produção da lesão A/E é resultado de uma interação específica e bem regulada entre a bactéria e a célula eucariótica. Esse evento ocorre em três etapas: aderência inicial, transdução do sinal e aderência íntima (Figura 01) (Nataro e Kaper, 1998).

A primeira etapa consiste na adesão da bactéria à superfície das microvilosidades da célula hospedeira. Essa aderência provoca a expressão de vários genes localizados em uma ilha de patogenicidade no cromossomo, denominado “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE). Na segunda etapa, ocorre transdução de sinais para a célula eucariótica por meio de um sistema de secreção do tipo III, que também está localizado na LEE. Através da fosforilação de várias proteínas da célula eucariótica, o sistema de secreção do tipo III causa alterações no citoesqueleto das células da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Na terceira etapa, ocorre a adesão íntima da bactéria à membrana citoplasmática do enterócito, levando à amplificação das alterações no citoesqueleto. Essa adesão é mediada pela intimina, uma proteína codificada pelo gene *eae*, localizado na ilha de patogenicidade LEE (Nataro e Kaper, 1998; Karmali, 2010).

Figura 01. Microvilosidades intestinais intactas (1) e lesão “attaching/effacing” no microscópio eletrônico (15.680x) (2). (a) Desaparecimento das microvilosidades do enterócito, (b) adesão íntima da bactéria ao enterócito, (c) estrutura em pedestal e (d) internalização da bactéria. Fonte: Mainil e Daube (2005).

Um terceiro fator é a enterohemolisina (Ehx), codificada pelo gene denominado de *ehxA* e que está contido no plasmídeo de virulência pO157, de aproximadamente 60 MDa. O gene estrutural *ehxA* possui 60% de homologia com o gene da α -hemolisina (*hlyA*), codificado pelo gene α -*hly* (Beutin, 2000; Feng e Monday, 2000).

A enterohemolisina é uma proteína de 110 kDa que se insere na membrana citoplasmática de células eucarióticas formando poros e levando à destruição destas células (Mainil e Daube, 2005).

Na atividade “in vivo”, apesar de haver uma forte associação entre a produção de Ehx e de Stx com o desenvolvimento de SHU e CH em humanos, a real contribuição de Ehx na patogênese de STEC permanece desconhecida (Saitoh et al., 2008). Porém, há relatos sugerindo que sua presença possa potencializar os efeitos causados pelas Stx, uma vez que a hemoglobina liberada pela ação da Ehx nos eritrócitos serve de estímulo para a multiplicação de cepas STEC no intestino (Nataro e Kaper, 1998; Paton e Paton, 1998a).

1.4 Infecções causadas por STEC

Como mencionado, STEC pode causar três diferentes tipos de complicações: CH, SHU e PTT. Porém, algumas pessoas infectadas podem ser assintomáticas (Karmali, 2010).

A habilidade do microrganismo em resistir ao ácido gástrico e em produzir fatores de patogenicidade como intimina, enterohemolisina e a própria toxina de Shiga são importantes no estabelecimento das infecções, além do sorotipo de STEC envolvido. Estudos demonstram que isolados produtores de Stx2 são mais frequentemente associadas com SHU do que as que são apenas Stx1 (Karmali, 2009; Zoja et al., 2010).

Após a ingestão do microrganismo, o período de incubação é de três a quatro dias, durante o qual ocorre a colonização do intestino grosso. No início, a doença é caracterizada por diarreia não sanguinolenta e dores abdominais severas que duram cerca de um ou dois dias progredindo, após o quarto dia, para diarreia sanguinolenta com desenvolvimento de CH (Meng et al., 2007; Karmali, 2009). Na maioria dos casos, os sintomas são autolimitados, com término após uma semana, no entanto, cerca de 6% dos pacientes com CH evoluem para SHU e, desses, metade requer diálise e 75% requerem transfusão sanguínea. A taxa de mortalidade dessa infecção é de aproximadamente 1% (Meng et al., 2007).

A SHU é caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal aguda e complicações no sistema nervoso central, podendo levar à morte. Trata-se de uma doença sistêmica onde o rim é o órgão mais frequentemente afetado, entretanto, o envolvimento de outros órgãos também é comum (Weil et al., 2010).

A lesão característica da SHU, a microangiopatia trombótica, consiste no espessamento das arteríolas e capilares, formação de edema e acúmulo de células endoteliais e plaquetas, que vão obstruir a circulação em diversos órgãos, principalmente nos rins (Zoja et al., 2010).

A incidência global de SHU é estimada em 1 a 2 casos por 100.000 habitantes/ano, com um pico maior em crianças menores de 5 anos de idade (6,1 casos por 100.000 habitantes/ano). Na Argentina e no Uruguai, onde as infecções por STEC são endêmicas, a ocorrência da doença é significativamente maior, com 10,5 casos por 100.000 habitantes/ano (Noris e Remuzzi, 2005). Com o acompanhamento médico, a mortalidade nos casos de SHU é menor que 10% entre crianças e adultos, porém, entre idosos, a taxa pode chegar a mais de 90% (Tsai, 2003).

Assemelhando-se com a SHU, a PTT também possui como características a trombocitopenia, a anemia hemolítica microangiopática e o comprometimento renal, diferindo apenas por apresentar febre frequente e envolvimento neurológico mais grave. A doença apresenta um envolvimento sistêmico maior, principalmente do sistema nervoso central, ocorrendo a formação de microtrombos e o surgimento de sinais neurológicos variados (Karmali, 2009; George, 2009).

O tratamento das infecções por STEC é basicamente de suporte. Não é recomendado o uso de antibióticos, pois além de promoverem uma maior liberação de Stx ao lisarem a parede bacteriana, podem causar o aumento da produção de toxinas devido ao stress sofrido pela bactéria frente ao antibiótico, tornando-as mais disponíveis para absorção, o que pode agravar o quadro clínico do paciente (Azagra e Iglesias, 2009).

Além da terapia de suporte não há, atualmente, outra forma de tratamento específico para infecções por STEC. Novas estratégias estão sendo testadas, como o uso de agentes bloqueadores de Stx no receptor intestinal e o uso de anticorpos monoclonais para Stx ou análogos ao receptor Gb3, para haver a ligação destes anticorpos ao sítio alvo levando à inativação da toxina (Trachtman et al., 2003; Sheiring et al., 2008; Niaudet, 2008; Azagra e Iglesias, 2009; Bitzan, 2009).

1.5 Gado bovino como reservatório de STEC

O gado bovino é considerado um importante reservatório deste patógeno, apesar da colonização do intestino e do modo de eliminação não estarem bem definidos. Os animais são colonizados transitoriamente e eliminam STEC nas fezes por um curto período de tempo. A concentração do microrganismo em fezes de gado varia de 10^2 a 10^5 UFC.g⁻¹, e sua prevalência e liberação foi relatada como sendo dependente da estação do ano nos Estados Unidos e na Europa, com aumento durante o verão (Karmali, 2010).

O primeiro relato de STEC em gado ocorreu em 1977 na Argentina e envolveu o sorotipo O157:H7 proveniente de um bezerro de 3 semanas com colibacilose (Orskov et al., 1987). Em muitos países foi encontrada prevalência de 60% de STEC em rebanhos bovinos, mas na maioria dos casos varia de 10 a 25% (Meng et al., 2007).

Chapman et al. (2001), no Reino Unido, identificaram STEC sorogrupo O157 em 620 (12,9%) de 4800 amostras de fezes de bovinos e em 21 (1,4%) de 1500 amostras de carcaças bovinas.

Varela-Hernández et al. (2007), no México, detectaram STEC em 0,8% (2/258) das amostras de carcaças de bovinos analisadas. Entretanto, uma frequência maior foi obtida por Nastasijevic et al. (2009), na Sérvia, com 2,8% (4/141) de amostras de carcaças positivas para o microrganismo.

Nos Estados Unidos, Brichta-Harhay et al (2008) analisaram a contaminação de couro e carcaças de bovinos por STEC O157:H7, e detectaram o microrganismo em 46,9% e 16,7% das amostras de couro e carcaças pre-evisceração, respectivamente.

No Brasil, o primeiro relato de isolamento de *E. coli* O157:H7 em gado bovino ocorreu em 1999 por Cerqueira et al., ao analisarem amostras de fezes de 197 bovinos de corte e leiteiro no Rio de Janeiro. STEC foi detectada em 71% (139/197) dos animais, sendo 82% (99/121) em gado leiteiro e 53% (40/76) em gado bovino. No entanto, apenas 1,5% (3/197) dos animais

apresentaram esse sorotipo, sendo 0,5% (1/197) de gado de corte e 1,0% (2/197) de gado leiteiro.

Em estudo no qual foram coletadas 153 amostras de fezes de gado selecionado em 6 fazendas leiteiras no estado de São Paulo, a percentagem de STEC isolada variou de 3,8 a 84,6%, dependendo da fazenda analisada. STEC foi identificada em 25,5% (39/153) dos animais e, dentre estes, 84,6% (33/39) estavam saudáveis (Irino et al., 2005).

No Rio Grande do Sul, Timm et al. (2007) obtiveram 39% de amostras positiva para STEC ao analisarem 100 “swabs” retais de gado bovino oriundos de 14 diferentes fazendas.

No Paraná, Farah et al. (2007) encontraram uma alta frequência de STEC em amostras de fezes de bovinos. Das 107 amostras analisadas, 61 (57%) foram positivas para STEC. Neste mesmo estado, Pigatto et al. (2008) analisaram amostras de fezes de 190 animais saudáveis de 43 abatedouros e detectaram STEC em 36% (69/190) dos animais. Em relação ao abatedouros analisados, 63% (27/43) continham ao menos um animal portador de STEC.

Oliveira et al. (2008), em Minas Gerais, detectaram STEC em 39,2% (40/102) das amostras de fezes de bovinos saudáveis destinados ao corte. *E. coli* O157 foi observada em apenas um animal.

Apesar dos vários estudos realizados com fezes de bovinos no Brasil, poucos são os relatos envolvendo carcaças. Em 2006, Rigobelo et al., em São Paulo, identificaram a presença de STEC em 1,2% (1/80) das amostras de carcaças. Fogo (2009), no mesmo estado, também isolaram STEC de apenas uma (0,5%) amostra de carcaça, entretanto, uma maior frequência foi obtida no couro dos animais, com 3% (6/198) de positividade.

Muitos fatores que afetam a prevalência dos microrganismos em carne “in natura” incluem o tipo de alimentação, transporte, processo de abate e uso de antimicrobianos. Manuseio e transporte podem deixar os animais estressados, o que pode aumentar a liberação de material fecal e patógenos. Barham et al. (2002) constataram um número maior de patógenos na pele dos animais durante o transporte do pasto à planta de processamento. O veículo de

transporte foi considerado uma possível fonte do patógeno, mas não se sabe qual seria a influência do uso de meios de transporte limpos e sanitizados na contaminação da pele dos animais que vão para o abatedouro.

Cobbold e Desmarchelier (2000, 2001) demonstraram que por volta do período de desmame, bezerros leiteiros apresentam o maior risco de transmissão, por excretarem uma porcentagem maior de STEC O157 do que o restante do rebanho.

A contaminação microbiana da carne pode ocorrer, principalmente, durante o abate, quando o couro é removido da carcaça do animal (coureamento) ou quando a carcaça entra em contato com o conteúdo intestinal durante a evisceração (Penney et al., 2007). Uma vez na superfície da carcaça, o patógeno pode ser disseminado pelo manuseio dos operadores. O subsequente abuso de temperatura na linha de produção ou na cadeia de varejo contribui para a multiplicação de microrganismos. A contaminação da carne por microrganismos patogênicos representa um risco significativo durante as diversas etapas do processamento, podendo chegar aos produtos finais, colocando em risco a saúde dos consumidores (Carney et al., 2006).

Foi demonstrado também que a contaminação secundária de alimentos com O157:H7 e outras cepas STEC pode ocorrer em etapas subsequentes ao abate do animal. STEC pode ser introduzida em produtos cozidos ou que não recebem tratamento térmico prévio através de contaminação cruzada pelo contato com carnes cruas, mãos, utensílios ou superfícies durante o preparo desses alimentos (Cagney et al., 2004; Mainil e Daube, 2005).

Rajpura et al. (2003) e Stirling et al. (2007) reportaram surtos de doenças por STEC O157 onde a causa mais provável foi a contaminação cruzada entre carnes cruas e cozidas ocorridas em lojas tipo “delicatessen” de supermercados do Reino Unido.

Os utensílios ou superfícies também são fatores fundamentais na contaminação cruzada dos alimentos. O estudo realizado por Warriner et al. (2002) demonstrou que o mesmo clone de *E.coli* foi isolado de uma carcaça de porco e de um equipamento usado no processamento dessa carne.

O processo de lavagem utilizado nas cozinhas domésticas não são eficientes na eliminação de *E. coli* O157:H7 presente nos utensílios ou superfícies, contribuindo na disseminação desses microrganismos (Mattick et al., 2003).

A contaminação de humanos ocorre através do consumo de alimentos contaminados, principalmente carne bovina cozida de maneira inadequada e leite não pasteurizado ou contaminado após pasteurização (Alam e Zurek, 2006). Entre os alimentos de origem animal, a carne moída merece atenção especial devido ao seu envolvimento em inúmeros surtos ocorridos nos Estados Unidos, no Canadá e na Europa. O mais recente ocorreu entre setembro e novembro de 2009, e envolveu 26 pessoas de oito estados dos EUA. O sorotipo O157:H7 foi identificado, e das 19 pessoas hospitalizadas, cinco desenvolveram SHU e duas foram a óbito (CDC, 2010b).

O maior surto de STEC registrado nos EUA ocorreu no período de Novembro de 1992 a Fevereiro de 1993 e atingiu 732 pessoas em quatro estados americanos. Dos pacientes envolvidos, 7,5% desenvolveram SHU e quatro foram a óbito. A causa do surto foi relacionada com o consumo de hambúrgueres servidos em uma rede de restaurantes do tipo “fast-food” (Bell et al., 1994; Shefer et al., 1996). Após esse fato, em 1994, o “Food Safety and Inspection Service”, do “US Department of Agriculture” (USDA – Serviço de Segurança e Inspeção Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) declarou que a carne crua contaminada com *E. coli* O157:H7 deve ser considerada como um produto adulterado e deve receber processamento que elimine o patógeno ou ser destruída. Essa determinação é responsável por inúmeros “recalls” de produtos cárneos, principalmente envolvendo a carne moída (Vanselow et al., 2005). Por esse fator, inúmeros estudos foram realizados envolvendo a carne moída e/ou hambúrguer e o isolamento de STEC.

Em 1990, Sekla et al. relataram a prevalência de 2,4% de positividade para *E. coli* O157 em amostras de carne moída obtidas em restaurantes tipo “fast-food” em Manitoba, Canadá.

Nos Estados Unidos, em um estudo realizado por Tarr et al. (1999) em Seattle, Washington, não houve isolamento de STEC de 1.400 amostras de

carne moída. Neste mesmo país, Samadpour et al. (2002), no condado de King, Washington, obtiveram 16,8% (50/296) de positividade para este grupo de microrganismo.

Em estudo realizado na Irlanda, foi relatada a prevalência de O157:H7 em amostras de carne bovina moída e de hambúrgueres adquiridos em açougues e supermercados. Do total de 1.533 amostras, 43 (2,8%) foram positivas para *E. coli* O157:H7, sendo 2,7% (32/1183) de supermercados e 3,14% (11/350) de açougues (Cagney et al., 2004).

Um levantamento, comparando 30 estudos de diferentes países realizado por Hussein e Bollinger (2005), nos EUA, revelou que as taxas de prevalência de STEC O157 variaram de 0,1% a 54,2% em carne moída, de 1,1% a 36,0% em cortes de varejo e de 0,01% a 43,4 em caracaças inteiras. Este mesmo levantamento revelou que para STEC não O157, a taxas variaram de 2,4% a 30,0% em carne moída, de 11,4% a 49,6% em cortes de varejo e de 1,7 a 58,0% em caracaças inteiras. EUA, Inglaterra, Canadá e Índia apresentaram as maiores frequências de isolamento.

Na Argentina, Roldán et al. (2007) detectaram O157:H7 em 1,2 % (3/250) dos produtos cárneos analisados e Auvray et al. (2007), na França, relataram a prevalência de 16,5% (27/164) para STEC em amostras de carne moída.

Chinen et al. (2009) pesquisaram STEC O157 em restaurantes “fast-food” de Buenos Aires, Argentina e, do total de 150 amostras de hambúrguer bovino, onze (7,3%) foram positivas para *E. coli* O157.

No Brasil, os dados sobre a ocorrência de STEC em carnes bovinas comercializadas no varejo são bastante limitados. Em 2007, Bergamini et al. detectaram STEC em 4 (3,5%) das 114 amostras de carne moída crua coletadas em Ribeirão Preto. Porém, não detectaram o microrganismo nas 136 amostras de carne moída adquiridas em Campinas, São Paulo. O mesmo resultado ocorreu com Silveira et al. (1999), que não detectaram *E. coli* O157:H7 em 886 amostras de hambúrgueres provenientes de oito diferentes produtores da região sul do Brasil, no período de janeiro a setembro de 1997.

Entretanto, não foram encontrados relatos sobre a pesquisa dessas bactérias em amostras de cortes de carne bovina.

1.6 Aves como reservatório de STEC

Apesar de Beery et al. (1985), nos Estados Unidos, verificarem que este microrganismo é capaz de colonizar o ceco de aves e ser excretado nas fezes por vários meses, a frequência de STEC em fezes, carcaças e carne de aves é extremamente baixa.

Pilipcinec et al. (1999), na Eslováquia, relataram a presença de *E. coli* O157 em 20 dos 216 “swabs” da cloaca de aves em abatedouros. Chapman et al. (1997), no Reino Unido, não isolaram o microrganismo de 1000 amostras de fezes de aves analisadas, o mesmo ocorrendo com Heuvelink et al. (1999a), na Holanda, quando analisaram 501 amostras e por Beutin et al. (1993), na Alemanha, com 720 amostras.

No que se refere à detecção de STEC em carnes de frango comercializadas no varejo, Heuvelink et al. (1999b), na Holanda, não isolaram o microrganismo em 819 amostras. Por outro lado, Chinen et al. (2009), na Argentina, detectaram STEC O157 em 4 (10,3%) das 39 amostras de carcaças e hambúrgueres de frangos.

No Brasil, as informações sobre a presença de STEC em carne de aves destinada ao varejo são escassas. O único trabalho encontrado na literatura consultada, foi realizado por Costa (2010), na cidade de São Paulo, que não detectou o microrganismo nas 138 amostras de coxa de frango comercializadas a granel em supermercados e hipermercados do município.

Como demonstrado acima, cepas de STEC são raras ou até mesmo ausentes entre as aves, entretanto, uma hipótese considerada por Chinen et al. (2009) para a contaminação da carne de aves é que esta, possivelmente, seria consequência de contaminação cruzada com carne bovina. A contaminação

poderia ocorrer tanto no início da cadeia de processamento dos alimentos como no fim, em estabelecimentos varejistas e domicílios.

Ao contrário do envolvimento de carne bovina com surtos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica, poucos são os relatos que incriminam a carne de aves nesses tipos de doença. Whittaker et al. (2009) relatam o envolvimento de carne de frango em um surto por STEC O157 ocorrido em 2007 que afetou indivíduos do País de Gales e de mais cinco regiões inglesas. Após investigação epidemiológica, doze casos foram associados ao consumo de “wrap” de frango, limão e coentro originários de uma única cadeia de supermercados.

Apesar dos produtos cárneos estarem constantemente envolvidos em surtos por STEC, outros alimentos também são responsáveis pela transmissão deste patógeno, como leite cru, queijos, hortaliças, frutas e água. A contaminação destes produtos pode ocorrer através do contado direto com fezes contaminadas ou indireto, durante a irrigação (Strachan et al., 2006). A transmissão através do contato com animais infectados e pelo contato pessoa-pessoa também já foi reportado (Karmali, 1989).

O envolvimento de vegetais em surtos pode ser exemplificado por relatos do CDC e do Eurosurveillance. Em 2006 ocorreram dois surtos de STEC associados ao consumo de hortaliças nos EUA. O primeiro envolveu 26 estados, com 199 casos e três óbitos e a salada de espinafre foi o possível veículo de transmissão. Já o outro surto, que atingiu cinco estados, com 71 casos, o alface foi o produto incriminado (CDC, 2010b). Em 2007, um grande surto ocorreu simultaneamente na Holanda e na Islândia, afetando 50 pessoas que haviam consumido alface minimamente processado originário de uma indústria holandesa de processamento de alimentos (Eurosurveillance, 2010).

Em face ao apresentado, apesar da posição de destaque que o Brasil ocupa na produção e exportação de carnes associado com a importância de se detectar STEC nesses alimentos, é necessário se ter um maior conhecimento

sobre a ocorrência desse microrganismo na linha de processamento de carne bovina e em cortes de carne bovina e de aves comercializados em nosso país.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em três pontos da linha de abate de bovinos destinados à exportação;

Avaliar a ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados no varejo da grande São Paulo, SP.

2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença dos fatores de virulência através dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *ehxA* nos isolados de *E. coli* obtidos;
- Identificar isolados de *E. coli* O157:H7 através da pesquisa dos genes *uidA*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7};
- Evidenciar a citotoxicidade em cultura de células Vero e a produção de enterohemolisina;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados obtidos;
- Identificar os sorotipos dos isolados de STEC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os meios de cultura utilizados são da marca Oxoid (Inglaterra), exceto quando especificado no texto. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

3. 1 Material

3.1.1 Cepas de microrganismos

Em todos os experimentos realizados utilizou-se uma cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933 como controle positivo e uma cepa de *E. coli* K12 como controle negativo, ambas gentilmente cedidas pela Dra. Kinue Irino do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. As cepas padrão foram mantidas à temperatura de -70° C em caldo triptona soja (TSB) adicionado de 20% de glicerol (Synth).

3.1.2 Coleta das amostras no abate de bovinos

A análise das amostras no abate de bovinos integra o projeto de pesquisa “Melhorando a qualidade e a segurança da carne bovina através de pesquisa e inovação” (ProSafeBeef). Trata-se de um projeto com iniciativa da União Européia com o intuito de avaliar a qualidade da carne bovina em toda sua cadeia produtiva. Além do Brasil, este projeto envolve outros 17 países e 42 instituições de pesquisa. No Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP foram realizadas análises quantitativas e qualitativas de quatro microrganismos patogênicos de

relevância em carne bovina: *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga sorogrupo O157, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter*.

A parte do ProSafeBeef na qual participamos foi realizado entre os meses de fevereiro de 2009 e março de 2010, quando foram analisadas 603 amostras coletadas de 201 animais provenientes de 19 fazendas localizadas em diferentes municípios dos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. Entre os animais, 85 eram de criação a campo e 116 eram de confinamento.

As amostras de couro e de carcaças bovinas foram obtidas em um abatedouro frigorífico localizado no interior do estado de São Paulo, com atuação no mercado de exportação, sendo responsável por 70% da carne exportada para a União Européia.

O estudo foi desenvolvido com amostras coletadas em três pontos da cadeia de produção de carne bovina: no couro na etapa pós-sangria, na carcaça na etapa pós-esfola e na meia carcaça na etapa pós-lavagem (antes de entrar na sala de resfriamento), conforme apresentado na figura 02.

Para a identificação dos animais, afixou-se uma placa de plástico colorido na pata traseira de cada animal no início do processo de abate, após a sua suspensão na nória, que assim continuou até o final do processo.

A amostragem foi realizada empregando-se a técnica de esfregaço de superfície. Para tanto, duas esponjas (Biotrace Int. Bioproducts e Nasco), previamente umedecidas com 10 mL de solução salina peptonada (0,1% peptona, 0,85% NaCl), foram friccionadas em duas áreas de 10 x 10 cm do lado direito do peito do animal e outras duas do lado esquerdo (Figura 03), perfazendo um total de 400 cm² de superfície amostrada. Este procedimento foi adotado para a coleta dos três pontos amostrados. As quatro esponjas foram transferidas para uma única bolsa plástica esterilizada (Nasco, EUA), devidamente identificada com o número do animal e o ponto de amostragem e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável que foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em até 8 horas.

Figura 02. Esquema do processo de abate de bovinos com indicações dos pontos de coleta.

Figura 03. Carcaças bovinas com indicação das regiões onde amostras superficiais de 400 cm² foram coletadas.

3.1.3 Coleta das amostras de varejo de bovinos e de aves

As amostras de cortes refrigerados de bovinos e de aves foram coletadas em açougues e supermercados de diferentes regiões da grande São Paulo/SP. Essas amostras foram mantidas a 7° C e, em até 12 horas após a coleta, foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

Foram analisadas 100 amostras de cortes refrigerados de bovinos, compreendendo 20 amostras de contrafilé (*M. longissimus dorsi*), 20 de coxão mole (*M. semi membranousus*), 20 de alcatra (*M. gluteus medius*), 20 de músculo (*M. triceps brachii*) e 20 de maminha (*M. gluteus medius*). Para a carne de ave também foram analisadas 100 amostras de carne de frango,

sendo 20 de asa, 20 de coxa com sobrecoxa, 20 de coxa, 20 de peito e 20 de coxinha da asa (*drummet*). Cada amostra foi composta de, aproximadamente, 500 g do produto.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das amostras de couro, carcaças bovinas, cortes bovinos e cortes de frangos

Para as amostras de couro e carcaças bovinas, 200 mL de solução salina peptonada foram adicionados às embalagens plásticas de amostragem contendo as quatro esponjas que foram homogeneizados durante 30 segundos em “stomacher” (Stomacher, 400, Seward, UK), para uma melhor liberação dos microrganismos aderidos às esponjas. Em seguida, uma porção de 40 mL foi transferida para um tubo tipo *falcon* para a análise de STEC, enquanto o restante foi utilizado para a análise dos outros microrganismos do projeto ProSafeBeef.

Os cortes de bovinos foram amostrados utilizando esponja umedecida com 10 mL de água peptonada tamponada (APT), perfazendo uma área de 25 cm², utilizando-se amostrador esterilizado. As esponjas foram depositadas em embalagens plásticas de amostragem contendo 200 mL de APT e submetidas à homogeneização em “stomacher” durante 30 segundos.

Para os cortes de frangos, a amostragem foi realizada empregando-se o método de enxágüe. Para tanto, os cortes, após serem assepticamente pesados, foram depositados em embalagens plásticas de amostragem contendo 200 mL de APT e friccionado, manualmente, em toda a superfície externa durante um minuto.

3.2.2 Pesquisa de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (ISO – “International Organization for Standardization” 16654 e SGDIA - “Surveillance Group for Diseases and Infections of Animals” NRM 006)

A pesquisa de isolados de STEC sorogrupo O157 (ISO 16654) (Figura 04) foi realizada nas amostras de couro, carcaças bovinas, cortes bovinos e cortes de frango, enquanto a pesquisa de isolados de STEC pertencentes aos sorogrupos O26, O103, O111 e O145 (SGDIA NRM 006) (Figura 05) foi realizada somente nas amostras de cortes bovino e de frango.

Para a pesquisa do sorogrupo O157, o homogeneizado das esponjas do couro, carcaça e cortes bovinos e a solução de enxágue dos cortes de frango foram centrifugados a 1000 g por 15 min (Centrífuga Sorvall Instruments, RC-5B, rotor GSA, Dupont, EUA) e o sedimento ressuspenso em 100 mL de caldo triptona soja modificado adicionado de novobiocina (mTSB+N), sendo incubado a 41,5° C/18-24 horas.

Para a pesquisa dos sorogrupos O26, O103, O111 e O145, o homogeneizado das esponjas dos cortes de bovinos e a solução de enxágue dos cortes de frango foram centrifugados, como descrito acima, e o sedimento ressuspenso em 100 mL de APT, sendo incubado a 37° C/18-24 horas.

Após o período de incubação, seguiu-se à técnica de separação imunomagnética (SIM) (Figura 06). Para isso, em microtubos de 1,5 mL, adicionou-se 1 mL do caldo de enriquecimento (mTSB+N ou APT) mais 20 µL de “beads” magnéticas revestidas com anticorpos específicos para O157, O26, O103, O111 e O145 (Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway). Para cada “bead” utilizou-se um microtubo diferente, assim como para cada caldo de enriquecimento. Os microtubos foram colocados, então, em uma estante específica para a realização dessa técnica. Essa estante foi invertida várias vezes e incubada em temperatura ambiente por 10 min, com leve agitação em um agitador (Dynal MX4 Sample Mixer, Invitrogen), garantindo a homogeneização da mistura. Transcorridos os 10 min, uma placa magnética foi inserida na estante, permanecendo na lateral dos microtubos por três min. A

ligação antígeno-anticorpo, captada pelo imã, fez com que se formasse um “pellet” na parede dos microtubos. O sobrenadante foi retirado, assim como a placa magnética, e o “pellet” foi ressuspenso em 1 mL de solução tampão (Anexo). Todo este procedimento foi realizado por mais duas vezes, sendo a última ressuspensão feita com apenas 100 µL da solução tampão.

Para a pesquisa do sorogrupo O157, os 100 µL da suspensão obtida após a SIM foram semeados, de maneira a se obter colônias isoladas, em ágar MacConkey sorbitol (SMAC) (1 µL), ágar MacConkey sorbitol adicionado de telurito de potássio e cefixima (SMAC-TC) (49,5 µL) e CHROMagar O157 (49,5 µL) (Dynal). Para a pesquisa dos demais sorogrupos utilizou-se ágar MacConkey (50 µL). As colônias suspeitas de cada placa (colônias transparentes em SMAC, colônias transparentes ou com centro levemente acinzentado em SMAC-TC, colônias violetas em CHROMagar O157 e colônias róseas em MacConkey) foram submetidas à série bioquímica em meios EPM (Toledo et al., 1982a), MILi (Toledo et al., 1982b) e Citrato de sódio.

As colônias, apresentando características bioquímicas de *E. coli* nesses meios, foram submetidas à identificação sorológica utilizando os soros anti-*E. coli* O157, anti-*E. coli* O26 e anti-*E. coli* O111 (Probac do Brasil). A sorologia para os sorogrupos O103 e O145 não pode ser realizada por esses soros não se encontrarem disponíveis no mercado interno.

Figura 04 – Representação esquemática da metodologia ISO 16654 empregada para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga sorogrupo O157 em amostras de couro, carcaça, cortes de bovinos e de frangos.

Figura 05 – Representação esquemática da metodologia SGDIA NRM 006 empregada para detecção de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga sorogrupos O26, O103, O111 e O145 em amostras de cortes bovinos e de frangos.

Figura 06. Representação esquemática do processo de separação imunomagnética.

3.2.3 Pesquisa das seqüências genéticas para *stx*₁ e *stx*₂, *eaeA*, *ehxA*, *uidA*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}

3.2.3.1 Preparo do DNA

As colônias apresentando características bioquímicas de *E. coli* foram semeadas em ágar nutriente e incubadas a 37° C “overnight”. Uma porção da cultura foi homogeneizada em microtubos contendo 300 µL de água ultra-purificada esterilizada (Milli-Q, Millipore) e submetida a aquecimento em banho seco (AccuBlock – Digital Dry Bath, Labnet, EUA) a 100° C por 10 min. Após o banho, os tubos foram imediatamente resfriados em gelo, submetidos à centrifugação a 14000 g por 3 seg (centrífuga 5417C- Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e congelados a -20° C até o momento de serem utilizados.

3.2.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Foram conduzidas três PCR independentes: uma *multiplex* para *stx*₁, *stx*₂, *uidA* e *eaeA*, uma *simplex* para pesquisa de *ehxA*, ambas segundo metodologia descrita por Feng e Monday (2000), com alterações (a PCR do gene *ehxA* foi conduzida separadamente dos demais genes), e uma terceira PCR para a pesquisa dos genes *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}, segundo metodologia de Cobbaut et al. (2009). Os “primers” utilizados estão apresentados na Tabela 02. As PCR foram realizadas a partir de uma solução contendo 3 µL do DNA teste (preparado como descrito no item 3.2.3.1), 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix [200 µM de cada dNTD e 1,5 mM de MgCl₂ - pH 8,5 (Promega Corporation, Madison, EUA)], adicionando-se cada um dos “primers” (IDT, EUA) nas concentrações de 10 pmoles para um volume final de reação de 25 µL.

A amplificação para os genes *stx*₁, *stx*₂, *uidA*, *eaeA* e *ehxA* foi realizada através de um aquecimento inicial (desnaturação) a 95° C por 3 min seguida de 25 ciclos de 1 min a 94° C; 1 min a 56° C e 1 min a 72° C e uma extensão final por 7 min a 72° C em termociclador Matercycler ep gradient S (Eppendorf). Para os genes *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}, usou-se amplificação com aquecimento inicial a 95° C por 1 min seguida de 30 ciclos de 15 s a 95° C; 15 s a 50° C e 30 s a 72° C e uma extensão final por 8 min a 72°C. Os produtos amplificados foram armazenados a 4 °C até o momento do uso.

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 da reação de PCR, constituído de água ultra-purificada esterilizada em substituição ao DNA teste.

Tabela 02. “Primers” utilizados na realização da PCR para *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, *ehxA*, *uidA* (Feng e Monday, 2000), *rfb*_{O157} (Paton e Paton, 1998b) e *fliC*_{H7} (Gannon et al., 1997).

“Gene alvo”	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>stx</i> ₁	F: cag tta atg tgg tgg cga agg	348
	R: cac cag aca atg taa ccg ctg	
<i>stx</i> ₂	F: atc cta ttc ccg gga gtt tac g	584
	R: gcg tca tcg tat aca cag gag c	
<i>eaeA</i>	F: att acc atc cac aca gac ggt	397
	R: aca gcg tgg ttg gat caa cct	
<i>ehxA</i>	F: gtt tat tct ggg gca ggc tc	158
	R: ctt cac gtc acc ata cat at	
<i>uidA</i>	F: gcg aaa act gtg gaa ttg gg	252
	R: tga tgc tcc atc act tcc tg	
<i>rfb</i> _{O157}	F: cac cag aca atg taa ccg ctg	259
	R: ttg cct atg tac agc taa tcc	
<i>fliC</i> _{H7}	F: gcg ctg tcg agt tct atc gac	625
	R: caa cgg tga ctt tat cgc cat tcc	

F: Forward; R: Reverse.

3.2.3.3 Análise do produto amplificado

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (Agargen) a 1,5% em tampão TBE 0,5X [0,9 M Tris (Pharmacia, EUA), 0,9 M ácido bórico (Pharmacia), 0,02 M EDTA (Pharmacia, EUA) – pH 8,2] e utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb GeneRuler™ 100 pb (Fermentas, Ontário, Canadá). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Gel XL Ultra V2 (Labnet, EUA) contendo tampão TBE 0,5X, durante 40 min a 70 V. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($1 \mu\text{g/mL}^{-1}$) (Pharmacia, EUA) e visualizado com o auxílio do sistema de fotodocumentação EDAS120 (Eastman Kodak, EUA), sob transiluminação UV 320 nm. Os padrões obtidos foram comparados visualmente.

3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica em células Vero (Gentry & Dalrymple, 1980)

Os isolados de *E. coli* que apresentaram as seqüências *stx*₁ e/ou *stx*₂ foram avaliadas quanto à produção de Stx através do teste de citotoxicidade em células Vero.

Este teste foi realizado com a colaboração da Prof^a Beatriz E. C. Guth do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo.

3.2.4.1 Preparo do sobrenadante das culturas de *E.coli*

Os isolados a serem avaliados foram semeados em tubos contendo 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubados por 18-24 h a 37° C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 g. Os

sobrenadantes obtidos foram filtrados em membranas esterilizantes (Milipore®) de 0,22 µm de porosidade e mantidos a -20° C até a realização do teste.

3.2.4.2 Teste de citotoxicidade

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

O meio presente nas placas [meio 199 adicionado de 1 mM de aminoácidos não essenciais e 2% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil)] foi vertido e substituído por 100 µL do mesmo meio preparado no momento do uso. Em seguida, foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes dos isolados a serem testados, todos em duplicatas.

As placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37° C (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) por 24 h, 48 h e 72 h, e a leitura realizada em microscópio invertido (Nikon, Tóquio, Japão), através da observação da lise celular, com leituras em 24 h, 48 h e 72 h de incubação.

Foi utilizada a cepa O157:H7 EDL-933 como controle positivo e *E. coli* K12 como controle negativo, além de um controle negativo do meio LB.

3.2.5 Pesquisa de atividade enterohemolítica (Beutin et al.,1989)

Os isolados que apresentaram as sequências *stx*₁ e/ou *stx*₂ e *ehxA* foram submetidos à pesquisa de atividade enterohemolítica. Para tanto, esses isolados foram inoculados em TSB e incubados “overnight” a 37° C. Posteriormente, foram semeados, por picada, em placas contendo ágar triptona de soja (TSA)

suplementado com 10 mM de CaCl_2 e 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado três vezes com solução fosfato salina tamponada (Anexo).

As placas foram incubadas a 37° C e a presença da atividade hemolítica foi verificada após 3 h e 24 h de incubação. Isolados que apresentaram um halo de hemólise após 3 h foram considerados produtores de α - hemolisina e isolados com atividade hemolítica após 24 h de incubação foram considerados produtores de enterohemolisina.

Foi utilizada a cepa O157:H7 EDL-933 como controle positivo e *E. coli* K12 como controle negativo, além de uma cepa de *E. coli* α -hemolítica.

3.2.6 Avaliação da sensibilidade antimicrobiana (Bauer et al., 1966)

A avaliação da sensibilidade antimicrobiana foi realizada pelo método de disco-difusão e interpretado de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004). Os isolados de STEC foram incubados em TSB a 37 °C por 24 horas. Após incubação, foi preparada uma suspensão em solução salina 0,85% equivalente a 0,5 na escala McFarland. Uma alíquota de 100 μL foi semeada por técnica de esgotamento com auxílio de “swab” na superfície do ágar Mueller-Hinton. Em seguida, foram aplicados os discos impregnados com os seguintes agentes antimicrobianos: 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) (Sensifar, Brasil).

As placas foram incubadas a 37° C por 16-18 horas. A leitura foi realizada medindo-se o halo de inibição em milímetros. Usou-se como controle positivo a cepa de *E. coli* ATCC 25922.

3.2.7 Determinação dos sorotipos

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

3.2.8 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A PFGE foi realizada conforme protocolo para *Escherichia coli* O157:H7 preconizado pelo PulseNet, CDC (Center for Disease Control and Prevention, EUA, 2010).

3.2.8.1 Suspensão celular

Os isolados e a cepa controle de *Salmonella* serovar Braenderup, utilizada como marcador de peso molecular no protocolo PulseNet segundo Hunter et al. (2005), foram inoculadas, por técnica de esgotamento, em placa de TSA e incubadas por 24h a 37° C. Após a incubação, verificou-se a pureza das culturas e semeou-se, por técnica de esgotamento, uma colônia isolada para nova placa de TSA, para a obtenção de crescimento em massa. Estas placas foram incubadas por 14 - 18 horas a 37° C.

Todo o crescimento foi removido com o auxílio de alça de níquel-cromo e transferido para tubos de ensaio contendo 3 mL de tampão de suspensão celular (CSB) [100mM Tris; 10mM EDTA - pH 8,0]. Determinou-se a absorbância dessa suspensão a 610 nm (Ultrospec 2000 – Pharmacia) e a

densidade óptica foi corrigida para 0,8 - 1,0 para obter uma suspensão celular suficiente à restrição.

A partir da suspensão com a densidade óptica corrigida, uma alíquota de 400 μL foi transferida para microtubos, onde foram adicionados 20 μL de proteinase K (20 mg.mL^{-1}) (Sigma, Nova Iorque, EUA). A solução foi agitada suavemente.

3.2.8.2 Preparo dos blocos de agarose

Aos tubos com a suspensão celular e proteinase K foram adicionados 400 μL de solução de agarose [1% Seakem Gold Agarose (Lonza, Rockland, EUA)] em 1% de TE (10mM Tris: 1mM EDTA - pH 8,0), previamente preparada. Após a homogeneização, aproximadamente 300 μL da mistura foram distribuídos nos moldes (BioRad, Califórnia, EUA) e mantidos à temperatura ambiente para a solidificação e formação dos blocos de agarose.

3.2.8.3 Lise celular e lavagens

Após a solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para tubos Falcon (50 mL) contendo 5 mL de solução de lise [50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8,00 + 1% de Sarcosina (Sigma)] e 25 μL de proteinase K e incubados por 2 h a 54° C sob agitação de 150 rpm, em incubadora com agitação (Innova 4000, Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, EUA). Os blocos foram submetidos a duas lavagens com 15 mL de água ultra-purificada, esterilizada, pré-aquecida a 50° C por 10 min, e quatro lavagens com 15 mL de tampão TE, esterilizado, também pré-aquecido a 50° C por 10 min. Todas as lavagens foram realizadas na incubadora com agitação de 150 rpm a 54° C. Os blocos de agarose foram armazenados em tubos Falcon contendo 10 mL de tampão TE, sob refrigeração, até a execução da restrição.

3.2.8.4 Restrição

Porções dos blocos (aproximadamente 2,0-2,5 mm) foram incubadas a 37° C por 15 min em tampão 1 x Tango (New England Biolabs, Ipswich, EUA). O tampão foi retirado e acrescentou-se 200 µL da solução de restrição [1 x Tango; 10 U. µL⁻¹ XbaI (Fermentas Life Sciences, Canadá)]. Os tubos foram gentilmente agitados incubados a 37° C por 2 h. As porções de blocos de agarose foram armazenadas em microtubos contendo 200 µL de tampão TBE, sob refrigeração, até o momento da utilização.

3.2.8.5 Eletroforese

Os produtos da digestão enzimática foram separados através de eletroforese em gel de agarose (1% Seakem Gold Agarose) em tampão TBE 0,5 X empregando-se o aparelho Chef-DR III System (BioRad) com os seguintes parâmetros: tempo de corrida: 18-19 h; voltagem: 6 V; ângulo: 120°; temperatura do tampão: 14° C; tempo inicial: 2,2 seg; tempo final: 54,2 seg. Após a eletroforese, o gel foi corado por 30 min em solução de brometo de etídio (1 µg.mL⁻¹) e examinado sob transiluminação UV 320 nm, sendo a imagem registrada com o auxílio do sistema Doc-It®LS (UVP Life Science Software, EUA).

3.2.8.6 Análise dos resultados

Os padrões de bandas gerados foram comparados visualmente e agrupados em perfis. A correlação entre os perfis obtidos foi avaliada com o auxílio do programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), utilizando-se o coeficiente de Dice (Dice, 1945) e análises de clusters UPGMA

(Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average) (Sneath e Sokal, 1973) para gerar o dendrograma, com valor de tolerância de 1%.

Para interpretação dos resultados, perfis com similaridade $\geq 80\%$ foram considerados semelhantes, e aqueles com similaridade de 100% foram considerados perfis clonais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocorrência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga no couro, carcaça e meia carcaça bovina

A presença de STEC do sorotipo O157:H7 foi observada em amostras de couro de dois animais (1,0%), com sete isolados. O microrganismo não foi detectado nas amostras de carcaça e meia-carcaça (Tabela 03).

Tabela 03. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) do sorotipo O157:H7 em amostras de couro, carcaça e meia carcaça de bovinos destinados à exportação para a União Européia.

Ponto das amostras	Nº de amostras	Nº de amostras positivas (%)
Couro pós sangria	201	2 (1,0%)
Carcaça pré evisceração	201	0 (0,0%)
Meia carcaça pós evisceração	201	0 (0,0%)
Total	603	2 (0,3%)

A detecção de STEC no couro indica que houve contato dos animais com fezes contaminadas antes do abate, provavelmente, na fazenda ou durante o transporte até o abatedouro.

Um único animal excretando o patógeno tem o potencial de contaminar muitos outros, tanto de forma direta como através do solo e na estabulação. Essa relação foi observada por Barkocy-Gallagher et al. (2003) que detectaram *E. coli* O157:H7 em 60,6% das amostras de pele dos bovinos antes do abate,

enquanto que a frequência do microrganismo nas fezes dos mesmos animais foi de 5,9%.

Como a pele dos bovinos está em constante contato com bactérias presentes no solo, fezes, água e pasto e, pelo fato das STEC resistirem por longos períodos nesses ambientes, o couro dos animais é uma das principais fontes de contaminação para a carcaça.

Na Tabela 04 são apresentados o perfil genético e sorotipo dos isolados obtidos. Nota-se que todos os isolados apresentaram os genes de virulência *stx*₂, *eaeA* e *ehxA*, além dos genes *uidA*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}, utilizados na caracterização do sorotipo O157:H7. Portanto, podemos agrupá-los no patotipo das *E. coli* enterohemorrágicas pertencentes ao sorotipo O157:H7. Apesar de apenas dois animais apresentarem contaminação no couro, é interessante salientar que o tipo de criação desses animais foi o confinamento.

Tabela 04. Características dos isolados positivos para STEC obtidos de dois animais analisados.

Identificação do animal	Tipo de criação	Origem	Perfil genético	Sorotipo (nº de isolados)
399	confinamento	couro	<i>stx</i> ₂ , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>uidA</i> , <i>rfb</i> _{O157} , <i>fliC</i> _{H7}	O157:H7 (3)
401	confinamento	couro	<i>stx</i> ₂ , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>uidA</i> , <i>rfb</i> _{O157} , <i>fliC</i> _{H7}	O157:H7 (4)

Os resultados característicos encontrados para a PCR multiplex dos genes *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *uidA*, para a PCR do gene *ehxA* e para a PCR multiplex dos genes *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}, podem ser observados nas Figuras 07, 08 e 09, respectivamente.

Figura 07. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *uidA* realizada para amostras de STEC segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (1 Kb); A1 e A2: amostras positivas para *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *uidA*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

Figura 08. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *ehxA* realizada para amostras de STEC segundo Feng e Monday (2000). M: marcador de peso molecular (1 Kb); A1 e A2: amostras positivas para *ehxA*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

Figura 09. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de *fliC_{H7}* e *rfb_{O157}* realizada para amostras de STEC segundo Cobbaut et al. (2009). M: marcador de peso molecular (1 Kb); A1, A2, A3 e A4: amostras positivas para *fliC_{H7}* e *rfb_{O157}*; C+: cepa de *E. coli* O157:H7 EDL-933; C-: cepa de *E. coli* K12; C1-: controle negativo da reação.

A baixa frequência de STEC encontrada nas amostras analisadas está de acordo com outros trabalhos realizados no Brasil (Rigobelo et al., 2006; Rigobelo et al., 2008; Fogo, 2009; von Laer, 2009).

Em 2006, Rigobelo et al. analisaram isolados de *E. coli* obtidos de 80 carcaças nas etapas de pré-evisceração, pós-evisceração e pós-processamento, em um frigorífico localizado no estado de São Paulo. STEC foi detectada em 1,2% (1/80) das amostras de carcaça e apresentava apenas o gene *stx₂*. Posteriormente, Rigobelo et al. (2008), ao analisarem 216 carcaças nas mesmas etapas descritas acima, detectaram esses microrganismos em 85 amostras. Porém, apenas três (1,4%) foram positivas para STEC. Dos isolados obtidos, um apresentou o gene *stx₁* e dois apresentaram os genes *stx₁* e *stx₂*. Os genes *eaeA* e *ehxA* não foram detectados. Diferentemente de nossa pesquisa, o sorotipo O157:H7 não foi isolado.

Fogo (2009), analisando amostras obtidas de animais (couro, carcaça e meia carcaça) no mesmo frigorífico desta pesquisa, no período de 2007 a 2009, relata uma maior frequência de STEC. De 198 animais analisados, o

patógeno foi identificado em sete (1,5%), sendo que seis (3,0%) foram isolados de couro e um (0,5%) de carcaça do animal. Assim como em nosso estudo, os isolados do couro apresentaram o perfil *stx*₂, *eaeA*, *uidA* e *ehxA*, e o isolado da carcaça apresentou o perfil *stx*₂, *uidA* e *ehxA*, o que revela um alto potencial patogênico dos isolados obtidos, principalmente do couro. O sorotipo O157:H7 foi o mais frequente entre eles.

Ainda em São Paulo, von Laer (2009), pesquisando os fatores de virulência de STEC entre 628 isolados de bovinos criados em regime de confinamento, detectou o microrganismo em 47 (7,5%). Dentre eles, 38 (81%) eram provenientes de couro e nove (19%) de carcaças. Entre as cepas que apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados, houve predominância de *stx*₁ (46,8%) sobre *stx*₂ (14,8%) e, entre as combinações de dois ou mais genes, o perfil *stx*₂, *ehxA*, *eaeA* e *uidA* (17%) também foi o mais observado.

Em trabalhos realizados em outros países, a ocorrência de STEC no couro e em carcaças é maior do que o relatado neste estudo (Elder et al., 2000; Arthur et al., 2002 e 2004; Carney et al., 2006; Varela-Hernandez et al., 2007; Alonso et al., 2007; Hiko et al., 2008; Bosilevac et al., 2009; Nastasiyevic et al., 2009; Etcheverría et al., 2010).

Nos Estados Unidos, Elder et al. (2000) estimaram a frequência de contaminação nas fezes, no couro e na carcaça de gado durante o processamento e constataram que dos 29 lotes de animais analisados, 72% apresentaram pelo menos uma amostra fecal positiva para EHEC O157 e 38% apresentaram amostras de couro positivas. A prevalência de EHEC O157 nas fezes e no couro foi de 28% (91/327) e 11% (38/355), respectivamente. Dos 30 lotes onde a carcaça foi analisada, 87% apresentaram pelo menos uma amostra positiva para EHEC na pré-evisceração, 57% na pós-evisceração antes de intervenção antimicrobiana, e 17% no pós-processamento. A prevalência de *E. coli* O157 nessas três etapas foi de 43% (148/341), 18% (59/332) e 2% (6/330), respectivamente. A maioria das amostras positivas apresentou os genes *stx*₁, *stx*₂, *uidA* e *ehxA*.

Também nos Estados Unidos, Arthur et al. (2002) detectaram STEC em 54% (180/334) das amostras de carcaça obtidas na etapa de pré-evisceração. Dois anos mais tarde, Arthur et al. (2004) detectaram o patógeno nas três etapas da linha de

abate analisadas. Dos 288 animais amostrados, 76% foram positivos no couro, 15% na carcaça pré-evisceração e 4% na carcaça pós-evisceração.

Assim como neste trabalho, os estudos de Elder et al. (2000) e Arthur et al. (2004), citados acima, indicam que boas práticas de higiene foram empregadas durante a esfola e a evisceração, etapas consideradas críticas para a contaminação da carne.

Na Irlanda, Carney et al. (2006), analisando aparas de carne, carcaças e carne da cabeça em um matadouro, constataram a presença de *E. coli* O157 em 2,4% (32/1351) das aparas de carne, 3% (4/132) da carcaça e 3% (3/100) da cabeça.

Alonso et al. (2007), na Itália, analisaram as fezes e as carcaças de 45 bovinos e detectaram *E. coli* O157:H7 em 12 (26,7%) deles, sendo onze (24,5%) provenientes de fezes e cinco de carcaças (11,1%).

No México, STEC foi detectada em 0,8% (2/258) das amostras de carcaças de bovinos analisadas por Varela-Hernández et al (2007). Dos dois isolados, um correspondia ao sorotipo O157:H7 apresentando os genes *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *hly*₉₃₃ e o outro pertencia a um sorotipo não O157, apresentando somente o gene *sxt*₁.

Hiko et al. (2008), na Etiópia, relataram a ocorrência de O157:H7 em 8% (20/250) das amostras de carne bovina obtidas em açougues, abatedouros municipais e abatedouros para exportação. A taxa de positividade, para cada um deles, foi de 9,3% (8/86), 8,1% (10/124) e 5% (2/40), respectivamente. Esses resultados indicam que os abatedouros destinados à exportação possuem medidas de prevenção e controle de STEC mais eficazes que os abatedouros municipais.

Outros relatos onde a ocorrência de STEC é maior foram feitos por Nastasijevic et al. (2009), na Sérvia, que detectaram *E. coli* O157 em 2,8% das 141 amostras de carcaças analisadas e por Bosilevac et al. (2009), nos Estados Unidos, com 71% e 33% das 1995 amostras de couro e carcaça contaminadas por *E. coli* O157:H7.

Em estudo mais recente, Etcheverría et al. (2010), na Argentina, onde a incidência de SHU causada por STEC é a mais alta do mundo, detectaram 12,3% (10/81), 18,6% (11/59) e 24,5% (13/52) de positividade nas amostras de carcaças coletadas no abatedouro, na sala de controle sanitário (lugar onde as carcaças chegam do abatedouro) e nos açougues, respectivamente. Estes resultados indicam um aumento da ocorrência de STEC enquanto as carcaças são transportadas do abatedouro até os pontos de venda, representando um risco potencial à saúde dos consumidores. Esses dados contrastam com os obtidos neste estudo, uma vez que a contaminação por STEC decresceu ao longo da cadeia de produção e comercialização da carne.

No levantamento realizado por Rhoades et al. (2009), onde foram comparados dados obtidos em diversos países, nota-se que a frequência de STEC nas fezes foi de 6,2%, variando entre 0,0% e 57%. No couro a média foi de 44%, percentagem bem maior que nas fezes. Entretanto, há um declínio na ocorrência de STEC ao longo do processo de abate, principalmente após a remoção do couro e aplicação de intervenção antimicrobiana, de modo que a frequência nas carcaças resfriadas foi em torno de 0,35%.

O grande número de variáveis às quais o gado está exposto (dietas, transporte, medidas higiênicas e regime de criação) pode influenciar os níveis de contaminação dos animais.

Entre essas variáveis, o regime de criação merece destaque. Nesse estudo, os animais positivos para STEC eram provenientes de fazendas com sistema de confinamento (Tabela 04), indicando que a maior proximidade entre eles contribui para a disseminação do patógeno. Isso foi verificado por Arthur et al. (2009) que demonstraram que os níveis de *E. coli* O157:H7 nas fezes e na pele de bovinos passou de 3% a 94% em um período de apenas duas semanas quando submetidos ao confinamento.

No trabalho realizado por McGee et al. (2004), um animal foi laboratorialmente contaminado por *E. coli* O157:H7 e colocado em confinamento com outros animais negativos para esse patógeno. Após 24 horas, todas as peles dos bovinos da mesma baia estavam contaminadas, além do solo e da água do ambiente.

O fato de o Brasil possuir apenas 6% do gado abatido em regime de confinamento, sendo a maior parte dele mantido em regime extensivo (Embrapa, 2010), pode explicar a menor ocorrência de STEC no couro de bovinos em nosso país em comparação a outros países.

Além do confinamento, o maior contato entre os animais e as condições higiênicas durante o transporte e nos currais antes do abate também influenciam os níveis de STEC. Brichta-Harhay et al. (2008) observaram uma maior ocorrência de *E. coli* O157:H7 em couro de bovinos amostrados no abatedouro em relação àqueles amostrados na fazenda. Em seu estudo, Arthur et al. (2007) avaliaram a contaminação por STEC em bovinos antes e após o transporte até o abatedouro e verificaram que a frequência do sorotipo O157:H7 aumentou de 50,3% na fazenda para 94,4% no abatedouro. Além disso, um estudo de rastreabilidade utilizando PFGE foi conduzido para avaliar a origem da contaminação das carcaças. Foi constatado que 80% dos isolados obtidos das carcaças no abatedouro apresentaram perfil genético distinto daquele apresentado pelos isolados das fezes coletadas na fazenda onde os animais estavam. Esses resultados revelam que a maior parte da contaminação das carcaças apresentou origem desconhecida. Os autores, então, sugerem que o transporte ao qual os animais foram submetidos após deixarem a fazenda e o ambiente dos currais onde os animais permanecem até o momento do abate podem ser a fonte de contaminação.

Jacob et al. (2010a) observaram que a dieta utilizada pelos animais pode alterar os níveis de ocorrência de *E. coli* O157:H7. Segundo os autores, o uso de alimentação à base de grãos destilados está associada ao aumento da concentração e eliminação desse microrganismo pelos animais.

É importante ressaltar a escolha pelo peito dos animais como lugar para a coleta das amostras, uma vez que essa região está sempre em contato direto com o solo e/ou com a carroceria dos caminhões durante o transporte, aumentando a probabilidade de contaminações. Esse fato pode ser evidenciado por Reid et al. (2002), na Inglaterra, que avaliaram a presença de patógenos entéricos em três regiões do couro de bovinos (peito, alcatra e

flanco) e observaram que a área mais contaminada por *E. coli* O157 (22,2%) foi o peito, seguido pelo flanco (4,4%) e alcatra (3,3%).

Os métodos de amostragem e detecção também influenciam os resultados. Os meios de cultura para pré-enriquecimento e isolamento de STEC vêm sendo constantemente modificados visando melhorar sua eficiência, uma vez que, quando presentes nos alimentos, esses microrganismos estão em quantidades muito baixas. Cagney et al. (2004), relataram que embora cepas de STEC estejam cada vez mais presentes nos sistemas de produção de carne, a maior detecção deste patógeno pode estar associada à utilização de métodos de isolamento mais sensíveis e específicos, tais como a SIM (Cagney et al., 2004). O estudo de Wright et al. (1994) demonstrou que a técnica de SIM é de 10 a 100 vezes mais sensível do que o enriquecimento e subcultura para o isolamento de *E. coli* O157 em amostras de bovinos.

Devido a esses diversos fatores, as comparações entre os estudos devem ser realizadas de forma cuidadosa.

Um outro fator importante a ser discutido é a baixa frequência de isolados de STEC nas amostras de couro e carcaça relatada por este e outros estudos anteriormente citados, que contrasta com o elevado número dessas cepas detectadas em fezes de bovinos hígidos ou com diarreia no Brasil (Cerqueira et al., 1999; Irino et al, 2005; Rigobelo et al, 2006; Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Farah et al., 2007; Oliveira et al., 2008). Isso demonstra que o abatedouro emprega medidas preventivas, como as boas práticas de higiene, que estão sendo eficientes nas etapas de abate, principalmente durante a remoção do couro e na evisceração, onde a probabilidade de contaminação é maior, podendo colocar em risco a inocuidade do produto.

Entretanto, embora a presença de STEC possa ser minimizada através de medidas de higiene e controle, é impossível sua erradicação do ambiente, uma vez que os animais são colonizados de forma assintomática e pelo fato de sobreviverem por longos períodos nas fezes, pasto e água (Caprioli et al., 2005).

Tendo em vista que existe uma forte associação entre a presença de *Stx2* e o desenvolvimento de SHU (Caprioli et al., 2005) e que a combinação de *stx2* e *eaeA* contribui para o desenvolvimento de infecções mais severas, assim como a presença de *ehxA* (Beutin et al., 1998; Boerlin et al., 1999; Welinder-Olsson et al., 2002; Eklund et al., 2002; Friedrich et al., 2002; Vaz et al., 2004; Prager et al., 2005; Bastos et al., 2006; Souza et al., 2007; Possé et al., 2007), os isolados de STEC deste trabalho, por apresentarem o genótipo *stx2*, *ehxA* e *eaeA*, representam um risco potencial à saúde pública caso haja falhas no controle higiênico-sanitário durante o abate.

Prager et al. (2005), na Alemanha, examinaram 266 isolados obtidos de amostras clínicas de infecções por STEC e verificaram que *ehxA* estava presente em 250 (94%) deles. Possé et al. (2007), na Bélgica, conduziram um estudo semelhante com isolados clínicos pertencentes aos sorogrupos O157, O103, O145, O111 e O126 obtidos na Alemanha, Eslovênia e Bélgica. Dos 84 isolados examinados, *ehxA* estava presente em 91,7% e *eaeA* em 97,6%. Nesse mesmo estudo, 27 isolados foram isolados de pacientes com SHU e *stx2* foi detectado em 26 (96,2%) deles.

Nos estudos realizados no Brasil, Souza et al. (2007) relataram um caso de SHU ocorrido em São Paulo no ano de 2005 onde o isolado positivo carregava apenas *stx2*. Bastos et al. (2006) estudaram 38 isolados de STEC provenientes de infecções humanas ocorridas no Brasil e na América Latina e identificaram *stx2* em 77,8% dos casos. Vaz et al. (2004) identificaram 29 cepas de STEC entre 2607 isolados clínicos de paciente com diarreia em São Paulo, no período de 1976 a 1999. Dessas cepas, 27 (93,1%) possuíam *eaeA* e 13 (44,8%) *ehxA*. Entretanto, nesse estudo, *stx1* (96,5%) foi mais identificado que *stx2* (6,9%).

Em relação ao sorotipo, todos os isolados foram positivos para O157:H7 (Tabela 04) através da pesquisa dos genes *uidA*, *rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}. Esses resultados foram confirmados pelo Instituto Adolfo Lutz, através da sorotipificação realizada pela identificação dos antígenos somáticos (O1 ao O181) e flagelares (H1 ao H56).

O fato de haver metodologias específicas para este sorotipo pode explicar sua predominância sobre os demais, uma vez que não há meios de isolamento direcionados para todos os sorogrupos de STEC, o que provavelmente contribui para a sub-notificação de cepas não-O157. Isto ocorre pois, historicamente, o sorotipo O157:H7 é considerado o mais importante na infecção clínica em diversas partes do mundo (Erickson e Doyle, 2007). Sendo assim, a grande maioria dos estudos sobre STEC é direcionado apenas à pesquisa deste sorotipo (Chapman et al., 2001; Cagney et al., 2004; Duffy et al., 2006; Arthur et al., 2007; Shriver-Lake et al., 2007; Varela-Hernández et al., 2007; Roldán et al., 2007; Brichta-Harhay et al., 2008; Hiko et al., 2008; Sarimehmetoglu et al., 2009; Arthur et al., 2009; Bosilevac et al., 2009; Dodd et al., 2010; Jacob et al., 2010b).

4.2 Ocorrência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga em cortes refrigerados de carne bovina

Das 100 amostras de cortes refrigerados de bovinos adquiridos no varejo da grande São Paulo, 86 foram positivas para a espécie *Escherichia coli* nos testes bioquímicos, obtendo-se 1233 isolados. Apesar de se ter isolado *E. coli* dessas amostras pela metodologia empregada, os fatores de virulência codificados por *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *ehxA* estão ausentes.

Não há informações na literatura sobre a ocorrência de STEC em cortes de bovinos adquiridos no varejo no Brasil. Os poucos trabalhos publicados sobre o assunto estão relacionados à carne moída e, apesar de indicarem uma baixa frequência do microrganismo, revelam que a carne moída é um importante veículo na transmissão de STEC, entre os produtos de origem animal (Cerqueira et al., 1997; Bergamini et al., 2007; Rodolpho e Marin, 2007).

Cerqueira et al. (1997), no Rio de Janeiro, analisaram 105 amostras de produtos cárneos, sendo 35 de carne moída refrigerada, 35 de hambúrgueres congelados e 35 de almôndegas congeladas. STEC foi detectada em 20

amostras (19%), sendo que nove (45%) pertenciam a amostras de carne moída, dez (50%) a amostras de hambúrgueres e uma (5%) a amostras de almôndegas. Entre os genes de virulência, *stx*₁ foi positivo em 8 (40%), *stx*₂ em 6 (30%) e *stx*₁ e *stx*₂ em 6 (30%) amostras de STEC. O sorotipo O157:H7 não foi detectado nesse estudo, entretanto, duas cepas (O113:H21 e NT:H21) estão entre os sorotipos não O157 mais comumente isolados de diarreia em humanos, evidenciando a importância da detecção de sorogrupos não-O157.

Nossos resultados concordam com os de Silveira et al. (1999), apesar de sua pesquisa ter sido realizada com 886 amostras de hambúrgueres provenientes de oito produtores da região sul do Brasil. Bergamini et al. (2007) também não detectaram o microrganismo ao analisarem 136 amostras de carne moída em Campinas, São Paulo. Por outro lado, no mesmo estudo, relatam uma prevalência de 3,5% (4/114) de STEC em carne moída adquirida em Ribeirão Preto, interior de São Paulo. Três amostras foram positivas para *stx*₂ e *ehxA* e uma amostra carregava os genes *stx*₁ e *stx*₂, enquanto *eaeA* não foi detectado. Os isolados pertenciam aos sorotipos O93:H19, ONT:HNT, ONT:H7 e O174:HNT.

Rodolpho e Marin (2007), em Taquaritinga, São Paulo, analisaram 23 açougues, coletando 91 amostras de carne moída, 42 amostras das mãos dos manipuladores e 154 amostras das máquinas moedoras de carne. STEC foi isolada de duas (2,1%) amostras de carne moída e de duas (1,2%) amostras de moedores, enquanto nenhuma amostra obtida das mãos dos manipuladores foi positiva. Somente o gene *stx*₂ foi detectado. Entre as amostras positivas, duas pertenciam ao mesmo açougue (uma de carne moída e uma de moedores), indicando que a higienização insatisfatória dos aparelhos torna-se uma fonte potencial de contaminação das carnes durante o processamento.

Em outros países, os trabalhos envolvendo carne moída também são mais frequentes e estão de acordo com os obtidos em nosso país (Chapman et al., 2000; Tarr et al., 1999; Heuvelink et al., 1999b; Chinen et al., 2001; Fantelli e Stephan, 2001; Vernozzy-Rozand et al., 2002; Samadpour et al., 2002; Dontorou et al., 2003; Cagney et al., 2004; Martínez et al., 2007; Varela et al., 2008; Abong'o e Momba, 2009; Nastasijevic et al., 2009; Chinen et al., 2009; Sarimehmetoglu et al., 2009).

Como o que acontece no Brasil, os estudos sobre a ocorrência de STEC em cortes de carne bovina em outros países também são bastante limitados.

Resultados semelhantes aos nossos foram relatados por Minami et al. (2010), na Tailândia, que também não isolaram STEC de 79 amostras de carne bovina e 46 amostras de carne de porco provenientes de supermercados e feiras-livres.

Por outro lado, há relatos na literatura sobre o isolamento de STEC em cortes de carne e produtos cárneos. Entre eles, pode ser citado o de Little et al. (1999), no Reino Unido, que encontraram STEC O157 em uma (0,5%) entre as 183 amostras de carne bovina adquiridas em diferentes açougues. Os mesmos autores, porém, analisaram 212 amostras ambientais obtidas de 105 casas de carnes e não detectaram esse microrganismo.

Nossos resultados também discordam dos obtidos por Al-Gallas et al. (2002), na Tunísia, que ao analisarem 120 amostras de carnes e produtos cárneos detectaram STEC em três (2,5%), sendo *stx*₂ detectado em todas as amostras, enquanto *stx*₁ foi detectado em duas e *eaeA* em apenas uma.

Na Palestina, Adwan e Adwan (2004) coletaram 300 amostras de carne bovina provenientes de açougues locais, e isolaram STEC de 44 (14,6%). Doze isolados foram identificados como O157; *stx*₁ foi detectado em três (25%) e *stx*₁ e *stx*₂ em nove (75%). Entre os 32 isolados identificados como não-O157, *stx*₁ foi detectado em seis (19%), *stx*₂ em quatro (12%) e *stx*₁ e *stx*₂ em 22 (69%).

Ao analisarem 134 amostras de carne bovina, Mayrhofer et al. (2004), na Áustria, evidenciaram o envolvimento das STEC nesse tipo de alimento. Em seu estudo, foram identificados dez isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos e, destes, sete pertenciam ao patotipo das STEC.

Na China, Koitabashi et al. (2008) analisaram 53 amostras de vários tipos de carnes vendidas em supermercados e açougues locais. Dessas, 31 foram de carne bovina, e a percentagem de STEC foi de 68% (21/31), sendo considerado o tipo de carne mais contaminado. Foram recuperados 30 isolados, com *stx*₁ tendo sido detectado em oito (26,6%), *stx*₂ em 11 (36,6%) e ambos os genes também em 11 (36,6%).

Lee et al. (2009), na Coréia do Sul, constataram a frequência de 0,93% para STEC em 750 amostras de carne bovina adquiridas no varejo do país no período de 2004 a 2006. Foram identificados quatro perfis genéticos pela PCR: stx2 (28,5%), stx1 e stx2 (28,5%), stx2 e eaeA (28,5%), stx1 e eaeA (14,3%).

Xia et al. (2010), nos EUA, analisaram a ocorrência de STEC em 7.258 isolados de *E. coli* coletados pelo Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana dos Estados Unidos, entre 2002 e 2007. Os isolados foram obtidos de carnes de varejo de diferentes supermercados e STEC foi positiva em 0,89% (16/1.806). Entre os genes de virulência, stx₁ foi detectado em 6,25% (1/16), stx₂ em 62,5% (10/16), stx₁, stx₂ e ehxA em 25% (4/16), stx₁ e stx₂ em 31% (5/16) e somente ehxA em 19% (3/16). O sorotipo mais encontrado foi o O83:H8, que não tinha sido isolado anteriormente de alimentos e animais.

4.3 Ocorrência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga em cortes refrigerados de frango

Das 100 amostras de cortes de frango analisadas, 91 foram positivas para *E. coli* nos testes bioquímicos, perfazendo 1428 isolados. Entretanto, assim como os resultados obtidos para os cortes de carne bovina, STEC também não foi detectada nessas amostras.

No Brasil, o único trabalho sobre a ocorrência de STEC em cortes de aves foi realizado por Costa (2010), em São Paulo, que obteve o mesmo resultado relatado neste trabalho ao analisar 138 amostras de coxa de frango crua comercializadas a granel em supermercados e hipermercados do município.

Diversos pesquisadores de outros países também relatam a não ocorrência de STEC em cortes de aves (Read et al., 1990; Heuvelink et al., 1996; Heuvelink et al., 1999b; Mayrhofer et al., 2004; Chomvarin et al., 2005;

Bohaychuk et al., 2006; Koitabashi et al., 2008; Esteban et al., 2008; Xia et al., 2010; Minami et al., 2010).

Read et al. (1990), em Ontário, Canadá, não detectaram nenhum sorotipo de STEC ao analisarem 200 amostras de pedaços de frango obtidos em duas plantas de processamento do país. O mesmo resultado foi alcançado por Mayrhofer et al. (2004), na Áustria, ao analisarem 288 amostras de frango adquiridas em estabelecimentos varejistas do país.

Nossos resultados também conferem com os obtidos por Heuvelink et al. (1996), na Holanda, que não isolaram STEC O157 de 300 amostras de produtos avícolas, e com os relatados por Heuvelink et al. (1999b) ao analisarem 819 amostras de carne de frango. Esteban et al. (2008), na Argentina, não isolaram esse sorogrupo em 60 lotes de aves provenientes de 34 granjas.

Chomvarin et al. (2005), na Tailândia, apesar de terem isolado o sorogrupo O157 de um sanduíche de carne de frango típico da região, não detectaram os genes de virulência *stx*₁ e *stx*₂.

Bohaychuk et al. (2006), no Canadá, analisando 800 amostras de produtos cárneos, distribuídas entre carne suína, bovina e de aves, verificaram que o patógeno estava ausente nas 201 amostras de frango analisadas, sendo 100 de coxa de frango e 101 de salsicha de frango.

Xia et al. (2010), nos EUA, analisaram a prevalência de STEC em 7.258 isolados de *E. coli* coletados pelo Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana dos Estados Unidos, entre 2002 e 2007. Os isolados foram obtidos de carnes adquiridas em supermercados e, entre eles, 2.179 foram recuperados de peito de frango. STEC não foi detectada em nenhum desses isolados, entretanto, *eaeA* estava presente em cinco deles (0,23%), tornando-os pertencentes ao patotipo das *E. coli* enteropatogênicas.

Outros trabalhos onde STEC estava ausente foram relatados por Minami et al. (2010), na Tailândia, que pesquisaram o patógeno em 61 amostras de carne de frango provenientes de supermercados e feiras-livres e por Koitabashi et al. (2008), na China, ao analisarem duas amostras obtidas no varejo do país.

Por outro lado, Chinen et al. (2009), ao pesquisarem STEC O157 em hambúrgueres de frango adquiridos em restaurantes “fast-food” de Buenos Aires, Argentina, detectaram STEC em 7,6% (6/79) das amostras de hambúrgueres de frango não cozidos e em 4,0% (2/50) de hambúrgueres de frango cozidos. A percentagem para os genes de virulência foi de 66,6% (4/6) para *stx*₁ e *stx*₂, 33,3% (2/6) para *stx*₂ e 0% (0/6) para *stx*₁ nos hambúrgueres não cozidos e de 50% (1/2) para *stx*₁ e *stx*₂, 50% (1/2) para *stx*₂ e 0% (0/2) para *stx*₁. Todas as amostras foram positivas para *eaeA* e *ehxA*. Neste mesmo estudo, detectaram STEC em 10,3% (4/39) das amostras de frango refrigerados e congelados. Foram detectados *stx*₁ e *stx*₂ em 75% (3/4), *stx*₂ em 25% (1/4), enquanto *stx*₁ não foi encontrado. Todas as amostras foram positivas para *eaeA* e *ehxA*. Este estudo evidencia a circulação de cepas potencialmente patogênicas na Argentina, o que pode contribuir para os elevados índices de SUH desse país.

Lee et al. (2009), na Coréia, também relatam a presença de STEC em carnes de frango comercializadas no varejo. O microrganismo foi detectado em 0,3% (3/900) das amostras estudadas. Dos fatores de virulência pesquisados através dos genes *stx*₁, *stx*₂ e *eaeA*, somente o gene *stx*₂ foi identificado nas três amostras. Os isolados pertenciam aos sorotipos O6, O15 e O128.

A comparação entre os resultados obtidos por este trabalho com os de outros autores torna-se difícil devido a influência de diversos fatores como a utilização de diferentes protocolos de amostragem, a metodologia usada no isolamento e identificação dos isolados, a qualidade higiênico-sanitária dos locais de coleta e também o tipo de amostra utilizada.

Como neste trabalho foram utilizadas amostras de cortes de bovinos, o que exclui a carne moída, considerada o principal produto cárneo envolvido em surtos por STEC, a baixa frequência desse patógeno encontrada em nosso estudo era esperada.

Mesmo não ocorrendo a detecção de STEC em amostras de carne bovina e de aves, é de suma importância a aplicação de medidas higiênicas e

de controle em todos os estabelecimentos envolvidos, pois embora se espere que a maioria das carnes e produtos cárneos seja devidamente cozida antes do consumo, o que ocasiona a destruição do patógeno, a presença de carnes contaminadas no varejo e a preferência pelo consumo de carnes consideradas mal-passadas por muitos consumidores pode colocar em risco a saúde pública.

Estes resultados são de extrema importância para o Brasil, considerado, tradicionalmente, como um dos maiores produtores e exportadores de carne pois a não detecção de STEC em amostras de carne bovina e de aves comercializadas no varejo da grande São Paulo indica que medidas eficazes para reduzir ou eliminar o risco de contaminação por estes microrganismos foram conduzidas nos diversos estágios da produção e comercialização do alimento. Como nos abatedouros não existe um procedimento de higienização específico para eliminar STEC, a aplicação de Boas Práticas Agrícolas (GAP), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) são necessárias em todas as etapas de produção da carne, desde a indústria até o comércio, principalmente por aqueles responsáveis pela manipulação e processamento da carne crua, uma vez que ficou evidenciado, por este estudo, a presença de STEC, mesmo que em baixa frequência, no couro de bovinos.

4.4 Citotoxicidade em células Vero

Nas avaliações realizadas após incubação de 24 e 48 h, três (42,9%) cepas apresentaram efeito citotóxico total, isto é, deslocamento celular maior que 50%, enquanto duas (28,6%) apresentaram efeito parcial, deslocamento celular menor que 50% e outras duas (28,6%) não apresentaram efeito. Entretanto, após 72 h de incubação, das sete cepas de STEC analisadas, cinco (71,4%) foram confirmadas como positivas para citotoxicidade total em células Vero e duas (28,6%) apresentaram baixo potencial citotóxico, sendo consideradas negativas (Figura 10). Esses resultados sugerem que não houve

expressão da toxina por essas duas cepas, apesar de apresentarem o gene que codifica para Stx, ou a secreção foi em quantidades muito baixas, não sendo possível a detecção pelo teste utilizado.

Outros autores também relatam a presença de cepas produtoras de toxina de Shiga em nosso país (Cerqueira et al., 1999; Bastos et al., 2006; Oliveira et al., 2008; Fogo, 2009) e em outros países (Friedrich et al., 2002; Zhang et al., 2005).

Cerqueira et al. (1999) relataram que 86,6% (13/15) das cepas de STEC originárias de amostras fecais no Rio de Janeiro, foram positivas para a produção de toxina de Shiga. Bastos et al. (2006) avaliando a citotoxicidade em células Vero de isolados obtidos de alimentos, bovinos e casos clínicos no Brasil e em outros países da América Latina, encontraram 84,2% (32/38) de positividade.

Em 2006, Oliveira et al., em Minas Gerais, verificaram que 87,2% (157/180) das cepas de STEC obtidas de gado bovino apresentaram forte efeito citotóxico em células Vero, enquanto 12,8% (23/180) demonstraram destruição incompleta dessas células. Fogo (2009), em São Paulo, observou a expressão dessa toxina em 18 (79,2%) dos 24 isolados de STEC obtidos do couro e da carcaça de bovinos.

No estudo realizado por Friedrich et al. (2002), na Alemanha, foram identificadas 44 (88%) cepas STEC que apresentaram efeito citopático em cultura celular. Para as cepas que não apresentaram citotoxicidade, os autores levantaram três possíveis hipóteses: (1) não ocorreu a expressão da toxina devido a uma mutação no gene; (2) as condições para a multiplicação não foram satisfatórias para haver a expressão do gene; (3) a toxina não foi secretada devido a defeitos no mecanismo de exportação. Ainda comentam que devido ao ambiente de laboratório ser diferente das verdadeiras condições *in vivo*, a não detecção da toxina nos ensaios com células Vero não significa que a mesma não possa ser sintetizada durante a infecção por STEC.

Na Alemanha, Zhang et al. (2005), analisando cepas de STEC não-O157 isoladas de humanos assintomáticos, com diarreia e com SHU, identificaram 31

(83,8%) cepas positivas para o teste de citotoxicidade em células Vero. Nas seis cepas consideradas negativas, não foram detectados problemas estruturais no gene *stx*. Sendo assim, os autores sugerem que os genes *stx* dessas cepas não tiveram origem em fagos ou estão localizados em fagos defeituosos, resultando em uma secreção da toxina em quantidades muito baixas.

Por outro lado, alguns pesquisadores obtiveram 100% das cepas de STEC positivas para a produção de citotoxicidade em células Vero (Al-Galas et al., 2002; Leomil et al., 2003; Vaz et al., 2004; Beutin et al., 2004; Farah, 2005; Roldán et al., 2007; Bergamini et al., 2007).

Figura 10. Perfil do efeito citotóxico em células Vero das cepas de STEC em 24, 48 e 72 h de incubação a 37° C em estufa de CO₂ (5%).

4.5 Pesquisa da atividade enterohemolítica

As cepas de STEC avaliadas neste estudo não apresentaram qualquer atividade hemolítica em placas de ágar sangue, seja para α -hemolisina ou para enterohemolisina. Pelo fato dessas cepas possuírem o gene que codifica para

enterohemolisina (*ehxA*), pode-se afirmar que o gene está presente, porém, a expressão desta proteína não está ocorrendo.

A avaliação da atividade enterohemolítica é muito utilizada como forma de triagem de isolados de *E. coli* possivelmente patogênicos, pois é considerada um marcador epidemiológico útil para a detecção de Stx, uma vez que sua síntese está relacionada com a produção de Stx, fato que não é observado em outros isolados de *E. coli* (Cookson et al., 2007). Entretanto, nossos resultados não condizem com essa afirmação, uma vez que entre os sete isolados positivos para Stx₂, nenhum apresentou a produção de atividade enterohemolítica em placas de ágar sangue.

Fogo (2009) relatou resultados semelhantes a este estudo, pois entre os 23 isolados positivos para *stx*, apenas dois (8,7%) produziram a atividade enterohemolítica, enquanto outros dois (8,7%) produziram α -hemólise.

Por outro lado, von Laer (2009) encontrou resultados satisfatórios quanto a utilização da atividade enterohemolítica para triagem de Stx. Ao pesquisarem a produção da atividade enterohemolítica de 21 isolados que apresentaram *ehxA* na PCR, verificaram que 14 (66,6%) expressaram a proteína, sendo que em 13 (92,8%) deles Stx foi detectada. Bergamini et al. (2007), analisando quatro isolados de STEC obtidos de carne moída, e Rigobelo et al. (2006) com um isolado obtido de carcaça bovina, obtiveram 100% de positividade na produção dessa hemolisina. No trabalho de Guth et al. (2003) todas as cepas pertencentes ao sorogrupo O157 expressaram *ehxA*, o mesmo tendo ocorrido com 85,7% (36/42) das não-O157.

Farah (2007), ao analisar 107 amostras fecais positivas para *E. coli* provenientes de bovinos no estado do Paraná, obteve 64 isolados positivos para *stx* e *ehxA* e, desses, 39 (61%) apresentaram produção de enterohemolisina. Contudo, em sete cepas foi detectado *ehxA* porém sem expressão do seu produto.

Analisando o perfil de 240 isolados de STEC provenientes de fezes de bovinos no estado de Minas Gerais, Oliveira et al. (2008) relataram que 170 (70,8%) deles foram positivos na avaliação da atividade enterohemolítica e que

todos os isolados de STEC que carregavam *ehxA* o expressaram em ágar sangue.

4.6 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Entre as sete cepas de STEC, uma (14,3%) apresentou resistência ao cloranfenicol e três (42,8%) ao ácido nalidíxico (Figura 11). Sendo assim, não houve a presença de multiresistência (resistência a três ou mais classes de antibióticos).

Esses resultados são similares aos obtidos por Radu et al. (2001) que também constataram resistência de isolados de STEC O157:H7 ao ácido nalidíxico (13%) e ao cloranfenicol (10%) e por Mora et al. (2005) que observaram 7% de isolados resistentes ao cloranfenicol. Conceição et al. (2006) avaliaram o perfil de doze cepas isoladas de fezes de bovinos que continham sorotipos previamente relacionados a SHU e relataram que 12,7% apresentaram resistência parcial ao cloranfenicol.

Diferente desses resultados, a maioria dos relatos de resistência a antibióticos por cepas de STEC estão entre os agentes ampicilina, tetraciclina e estreptomicina (Khan et al., 2002; Mayrhofer et al., 2004; Rigobelo et al., 2006, 2008; Bastos et al., 2006; Scott et al., 2009; Abong'o e Momba, 2009). Isso pode ocorrer, segundo Rigobelo et al., 2008, pelo fato de que como os genes de resistência a esses agentes estão localizados em plasmídeos, a maior resistência a essas drogas pode ser resultado da disseminação de elementos móveis entre as cepas de STEC.

Antimicrobianos são comumente utilizados na prevenção e no tratamento de infecções assim como promotores de crescimento para animais de produção. Entretanto, o uso indiscriminado desses agentes pode conferir resistência adaptativa e diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos utilizados. Em seu trabalho, Zhao et al. (2001) relataram que cepas STEC possuem integrons capazes de codificar genes de resistência a antibióticos,

podendo haver transferência desses genes, o que contribui para o aumento de cepas resistentes.

É importante ressaltar que o estudo da suscetibilidade antimicrobiana foi realizado a fim de se verificar o perfil das cepas circulantes na cadeia de produção da carne, uma vez que o uso de antimicrobianos para o tratamento de infecção em humanos causada por STEC não é recomendado.

Figura 11. Perfil de suscetibilidade das cepas de STEC obtidos frente a diferentes antimicrobianos.

4.7 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A análise do dendrograma demonstrou que as sete cepas de STEC isoladas apresentaram dois perfis genéticos distintos, com similaridade entre eles de 75,3%. O perfil 1 (P1) foi composto por quatro cepas, isoladas do mesmo animal, e o perfil 2 (P2) por três cepas, também isoladas de um único animal (Figura 12).

Nota-se que, apesar de serem de perfis diferentes, todas as cepas pertencem ao sorotipo O157:H7, indicando que apresentam origens clonais

distintas. Isso está de acordo com os resultados obtidos por Bastos et al. (2006) que tipificaram cepas de STEC provenientes de casos clínicos, alimentos e bovinos de diversos países. Foram identificados 52 perfis distintos mesmo se tratando de cepas pertencentes a um mesmo sorotipo/sorogrupo. A análise do PFGE relatada por Islam et al. (2010), em Bangladesh, revelou que as sete cepas de STEC O157 obtidas de carne bovina apresentaram seis perfis distintos, sugerindo um grupo geneticamente heterogêneo apesar de pertencerem ao mesmo sorogrupo.

Por outro lado, Roldán et al. (2007), na Argentina, analisaram por PFGE cepas de STEC isoladas de amostras de carne e produtos cárneos e constaram que as três cepas O157:H7 detectadas pertenciam a perfis considerados semelhantes, pois apresentaram similaridade acima de 80%.

Devido ao baixo número de cepas e de terem sido isoladas de apenas dois animais diferentes, este estudo não apresentou grande diversidade genética ao contrário do observado por Xia et al. (2010) que identificaram 14 padrões distintos de PFGE ao analisarem 17 cepas de STEC isoladas de carnes vendidas no varejo de quatro estados dos Estados Unidos (Geórgia, Maryland, Oregon e Tennessee).

Alta diversidade genética também foi relatada por von Laer (2009) que, ao tipificar por PFGE 66 cepas obtidas de fezes, carcaças e água, encontraram 29 perfis distintos, sendo 12 exclusivos para uma única cepa. De acordo com o autor, pelo fato de a maioria dos perfis agruparem cepas pertencentes a diferentes sorogrupos/sorotipos e origens, há a existência de uma origem clonal comum entre as cepas desses perfis.

Figura 07. Representação da relação genética entre os dois perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição XbaI a partir de sete cepas de STEC isoladas neste estudo.

Legenda: A e B - 100% de similaridade; C - 75,3%.

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos e a discussão do presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os genes *uidA*, *rfb*_{O157} e *flic*_{H7} mostraram ser bons marcadores para a identificação do sorotipo O157:H7 de *E. coli*, pois todos os isolados de STEC que os apresentaram aglutinaram com os soros específicos;
- A utilização da produção de enterohemolisina como marcador epidemiológico para Stx não foi eficaz, visto que nenhum dos isolados produtores de toxina apresentou a atividade enterohemolítica;
- O genótipo *stx*₂, *eaeA* e *ehxA* presente em todas as cepas de STEC isoladas do couro confere-lhes um maior potencial de virulência, podendo representar risco elevado à saúde pública caso haja falhas no controle higiênico-sanitário durante o abate;
- Apesar de presente no couro, o não isolamento de STEC em etapas posteriores da cadeia de produção da carne indica que o abatedouro onde foi realizado a coleta apresenta boas condições de higiene, uma vez que não houve isolamento de carcaças e meia carcaças bovinas;
- Não foi observado a contaminação por STEC nos cortes refrigerados de carne bovina, o que indica que medidas sanitárias foram eficientes no controle da contaminação cruzada e da transmissão desse patógeno desde a produção até a comercialização da carne;
- Também não houve a presença de STEC nos cortes refrigerados de aves, demonstrando que, na cidade de São Paulo, esse alimento pode não ser um veículo potencial de transmissão de STEC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF – Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em 15 fev. 2010.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em 15 fev. 2010.

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

ADWAN, G.M.; ADWAN, K.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 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.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.297-306, 2007.

AL-GALLAS, N.; BENAÏSSA, R.; ANNABI, Th. A.; BAHRI, O.; BUDABOUS, A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. **Food Microbiology**, vol. 19, n. 3, p. 89-398, 2002.

ALONSO, S.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHIB, 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. **International Microbiology**, v. 10, p. 109-116, 2007.

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 Environmental Microbiology**. v. 68, n. 10, p.4847-4852, 2002.

ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; GUERINI, M. N.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 280-286, 2007.

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. **Journal of Food Protection**. v. 67, n.4, p. 658-665, 2004.

ARTHUR, T.M.; KEEN, J.E.; BOSILEVAC, J.M.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; NOU, X.; KOOHMARAIE, M. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6515-6523, 2009.

AUVRAY, F.; LECUREUIL, C.; TACHÉ, J.; LECLERC, V.; DEPERROIS, V.; LOMBARD, B. Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 646–65, 2007.

AZAGRA, A.M.; IGLESIAIS, M.I. Síndrome hemolítico urémico. **Anales de pediatria continuada**, v. 7, n. 2, p.79-88, 2009.

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. **Journal of Food Protection**, 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. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 1978-1986, 2003.

BASTOS, F.C.; 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 Microbiology Letters**. 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 Journal of Clinical Pathology**. v. 45, n.4, p. 493-496, 1966.

BEERY, J. T.; DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 310-315, 1985.

BELL, B.P.; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P.M.; Davis MA, GORDON, D.C.; TARR, P.I.; BARTLESON, C.A.; LEWIS, J.H.; BARRET, T.J.; WELLS, J.G. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 - associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. **The Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1349-1353, 1994.

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 Microbiology Letters**, 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 Journal of Microbiology**, v.38, p.553-556, 2007.

BEUTIN, L. Plasmids in VTEC: their role in virulence and their use in typing. In Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe: Pathogenicity and Virulence. Castlenock, Dublin, Ireland: Teagasc, **The National Food Centre**, p. 126–139, 2000.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) -producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2483–2488, 1993.

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

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Human infections with Shiga toxinproducing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerging Infection Disease**, v. 4, n.4, p. 635-639, 1998.

BITZAN, M. Treatment options for HUS secondary to *Escherichia coli* O157:H7. **Kidney International Supplied**, v. 75, p. 62–66, 2009.

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 diseases in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 31, p. 497-503, 1999.

BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; KING, R. K.; MANNINEN, K. I.; SORENSEN, O.; WU, J. T.; STILES, M. E.; MCMULLEN, L. M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**. v. 69, n. 9, p. 2176-2182, 2006.

BOSILEVAC, J.M.; ARTHUR, T.M.; BONO, J.L.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D.A.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L. KOOHMARAIE, M. Prevalence and Enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. Abattoirs that Process Fewer than 1,000 Head of Cattle per Day. **Journal of Food Protection**. v. 72, n. 6, p. 1272-1278, 2009.

BRICHTA-HARHAY, D. M.; GUERINI, M. N.; ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 74, n. 20, p. 6289-6297, 2008.

BROOKS, J.T.; SOWERS, E.G.; WELLS, J.G.; GREENE, K.D.; GRIFFIN, P.M.; HOEKSTRA, R.M.; STROCKBINE, N.A. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. **Journal of Infection and Disease**, v. 192, p. 1422-1429, 2005.

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

CAPRIOLI, A.; LUZZI, I.; ROSMINI, F. Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 169, p. 208-211, 1994.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, p. 289-311, 2005.

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 Microbiology**, v. 23, p. 52-59, 2006.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/ecoli_o157h7/index.html#who>. Acesso em 18 fev. 2010a.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>>. Acesso em: 18 de fev. 2010b.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. One-day (24-28h) Standardized Laboratory Protocol for molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). In: **PulseNet section** 5.1, 5.2, 5.4, p.1-15, 2010.

CERGOLE-NOVELLA, M. C., NICHIMURA, 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 Microbiology Letters**, v. 259, p. 234–239, 2006.

CERGOLE-NOVELLA, M. C., NICHIMURA, 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 Microbiology Letters**, 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. **Journal of Food Protection**, 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. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 111–121, 1999.

CHAPMAN, P. A.; ELLINAND, M.; ASHTON, R. Evaluation of a novel enrichment procedure for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally contaminated raw beef, lamb and mixed meat products. **Food Microbiology**, v. 18, p. 471–478, 2001.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; CERDAN MALO, A. T.; HARKIN, M. A. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemiology and Infection**, v. 119, p. 245–250, 1997.

CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A.; CERDAN MALO, A.T.; HARKIN, M.A. A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 207–213, 2000.

CHAPMAN, P.A. Verotoxin-producing *Escherichia coli*: an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *E. coli* O157. **Food Control**, v. 6, p. 187–193, 1995.

CHINEN, I.; EPSZTEYN, S.; MELAMED, C.L.; AGUERRE, L.; ESPINOSA, E.M.; MOTTER, M.M.; BASCHKIER, A.; MANFREDI, E.; MILIWEBSKY, E.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 167–171, 2009.

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

CHOMVARIN, C.; RATCHTRACHENCHAI, O.A.; CHANTARASUK, Y.; SRIGULBUTR, S.; CHAICUMPAR, K.; NAMWAT, W. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from food in Khon Kaen, Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, p. 931–939, 2005.

COBBAUT, K.; BERKVEN, D.; HOUF, K.; DEKEN, R.; ZUTTER, L. *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. **Journal of Food Protection**, v.72; p.1848-1853, 2009.

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

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

CONCEIÇÃO, R.C.S.; DIAS, P.A.; HENTGES, A.; BRASIL, N.D.A.; ALEIXO, J.A.G.; TIMM, C.D. Sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga (STEC) de sorotipos relacionados com síndrome hemolítica urêmica. **Anais do XV Congresso de Iniciação Científica**, 2006.

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 Environmental Microbiology**, v. 73, n.20, p.6360-6369, 2007.

COOMBES, B.K., WICKHAM, M.E., MASCARENHAS, M., GRUENHEID, S., BRETT FINLAY, B., KARMALI, M.A. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2153–2160, 2008.

COSTA, C.A.R. Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 112p, 2010.

DE TONI, F.; DE SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; KLASSEN, G.; IRINO, K.; RIGO, L.R.; STEFFENS, M.B.R.; FIALHO, 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. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 645–647, 2009.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, p.297-302, 1945.

DIPINETO, L.; SANTANIELLO, A.; FONTANELLA, M.; LAGOS, K.; FIORETTI, A.; MENNA, L.F. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 293–295, 2006.

DODD, C.C.; RENTER, D.G.; FOX, J.T.; SHI, X.; SANDERSON, M.W.; NAGARAJA, T.G. Genetic relatedness of *Escherichia coli* O157 isolates from cattle feces and preintervention beef carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 4, p. 2010.

DONTOROU, C.; PAPADOPOULOU, C.; FILIOUSSIS, G.; ECONOMOU, V.; APOSTOLOU, I.; ZAKKAS, G.; SALAMOURA, A.; KANSOUZIDOU, A.; LEVIDIOTOU, S. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 273–279, 2003.

DUFFY, G.; CUMMINS, E.; NALLY, P.; O'BRIEN, S.; BUTLER, F. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. **Meat Science**, v. 74, p. 76-88, 2006.

DUFFY, G.; GARVEY, P.; MC DOWELL, D.A. Nomenclature of verocytotoxins. In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. **Food and Nutrition Press**, p. 447–452. 2001.

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

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *E. coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4585-4593, 2002.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 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.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc64/>>. Acesso em 30 de set. de 2010.

ERICKSON, M. C.; DOYLE, M. P. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2426-2449, 2007.

ESTEBAN, J.I.; OPORTO, B.; ADURIZ, G.; JUSTE, R.A.; HURTADO, A. A survey of food-borne pathogens in free-range poultry farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 123, p. 177-82, 2008.

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

EUROSURVEILLANCE – Europe's Journal on Infectious Disease epidemiology, prevention and control. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org>>. Acesso em: 10 de maio de 2010.

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

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 63–69, 2001.

FARAH, S.M.S.S.; DE SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; IRINO, K.; DA 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 Parana State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 607–612, 2007.

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.

FOGO, V. S. 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. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 75p. 2009.

FRIEDRICH, A. W.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W. L.; PULZ, M.; KUCZIUS, T.; AMMON, A.; KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **Journal of Infection Diseases**, v. 185, p. 74-84, 2002.

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

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

GEORGE, J.N. The thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes: overview of pathogenesis (Experience of The Oklahoma TTP-HUS Registry, 1989–2007). **Kidney International**, v. 75, n. 112, p. 8–10, 2009.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 271-309, 2008.

GUTH, B.E.C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.F.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.C.; BASCHKER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin-producing genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 335-349, 2003.

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 Infection Disease**, v. 8, n. 5, 2002.

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

HEUVELINK, A. E., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M., VAN DEN BIGGELAAR, F.L.A.M., VAN LEEUWEN, W.J., E. DE BOER. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. **International Journal of Food Microbiology**. v. 52, p.67-75, 1999a.

HEUVELINK, A. E.; WERNARS, K.; DE BOER, E. Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in retail raw meats in The Netherlands. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 1267–1272, 1996.

HEUVELINK, A.E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M.; BEUMER, R.R.; DE BOER, E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 1115–1122, 1999b.

HIKO, A.; ASRAT, D.; ZEWEDE, G. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in retail raw meat products in Ethiopia. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 5, p. 389-393, 2008.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. Ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 751p., 1994.

HUNTER, S.B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M.A.; DUYNE, S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T.; RIBOT, E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulse-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1045-1050, 2005.

HUPPERTZ, H.I.; BUSCH, D.; SCHMIDT, H.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. **Journal of Pediatric**, v. 128, p. 341-346, 1996.

HUSSEIN, H.S.; BOLLINGER, L.M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. **Meat Science**, v. 71, p. 676–689, 2005.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. 6. Microbial Ecology of Food Commodities. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.

IEA - Instituto de Economia Agrícola. Procedimentos para certificação sanitária de exportações. Disponível em: <www.iea.sp.gov.br/out/publicacoes/manual-exp.htm>. Acesso em: 15 fev. 2010.

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 Infectious Diseases**, v. 8, p. 446–447, 2002.

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. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 565–567, 2007.

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

ISLAM, M.A.; MONDOL, A.S.; AZMI, I.J.; BOER, E.; BEUMER, R.R.; ZWIETERING, M.H.; HEUVELINK, A.E.; TALUKDER, K.A. Occurrence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw meat, raw milk, and street vended juices in Bangladesh. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 11, p. 1381-1385, 2010.

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

JACOB, M. E.; PADDOCK, Z. D.; RENTER, D. G.; LECHTENBERG, K. F.; NAGARAJA, T. G. Inclusion of dried or wet distillers' grains at different levels in diets of feedlot cattle affects fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7238-7242, 2010a.

JACOB, M. E.; RENTER, D. G.; NAGARAJA, T. G. Animal- and truckload-level associations between *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides at

harvest and contamination of preevisceration beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1030-1037, 2010b.

JOHNSON, K.E.; THORPE, C.M.; SEARS, C.L. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Disease**, v. 43, p. 1587-1595, 2006.

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

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

KARMALI, M.A. Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. **Kidney International**, v. 75, n. 112, p.4-7, 2009.

KARMALI, M.A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 360-370, 2010.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, 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. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 188, p. 73-78, 1999.

KOITABASHI, T.; CUI, S.; KAMRUZZAMAN, M.; NISHIBUCHI, M. Isolation and Characterization of the Shiga toxin Gene (*stx*)–bearing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 from retail meats in Shandong Province, China, and characterization of the O157-derived *stx2* phages. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 706–713, 2008.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.L.; STARVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

LEE, G.Y.; JANG, H.I.; HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**. v. 134, n. 3, p. 196-200, 2009.

LITTLE, C.; GILLESPIE, I.; DE LOUVOIS, J.; MITCHELL, R. Microbiological investigation of halal butchery products and butchers' premises. **Communicable Disease and Public Health**, v. 2, n. 2, p. 114-8, 1999.

MAINIL, J.G.; DAUBE, G.A. Review, verocytotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1322–1344, 2005.

MARTÍNEZ, A.J.; BOSSIO, C.P.; DURANGO, A.C.; VANEGAS, M.C. Characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 12, p. 2843–2846, 2007.

MATTICK, K., DURHAM, K., DOMINGUE, G., JORGENSEN, F., SEN, M., SCHAFFNER, D.W., HUMPHREY, T. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 213–226, 2003.

MAURER, J.J.; SCHMIDT, D.; PETROSKO, P.; SANCHEZ, S.; BOLTON, L.; LEE, M.D. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2954–2960, 1999.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.; HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 23–29, 2004.

MC GEE, P.; SCOTT, L.; SHERIDAN, J.J.; EARLEY, B.; LEONARD, N. Horizontal transmission of *Escherichia coli* O157:H7 during cattle housing. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2651–2656, 2004.

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

MINAMI, A.; CHAICUMPA, W.; CHONGSA-NGUAN, M.; SAMOSORNSUK, S.; MONDEN, S.; TAKESHI, K.; MAKINO, S.; KAWAMOTO, K. Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. **Food Control**, v. 21, p. 221–226, 2010.

MORA, A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin) – producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Res. Microbiol.**, v. 156, p. 793–806, 2005.

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, p. 101–105, 2009.

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

NIAUDET, M.D. Treatment of Shiga-like toxin associates (typical) hemolytic uremic syndrome in children. In: **UpToDate on-line**, 16.2, 2008.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Hemolytic uremic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, p. 1035-1050, 2005.

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. **International Journal of Food Microbiology**. v. 127, p. 139–146, 2008.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; VILLAR, J.A. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet ii**: 276, 1987.

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

PATON, J.C.; PATON, A.W. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *enterohemorrhagic E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.598-602, 1998b.

PENNEY, N.; BIGWOOD, T.; BAREA, H.; PULFORD, D.; LeROUX, G.; COOK, R.; JARVIS, G.; BRIGHTWELL, G. Efficacy of a peroxyacetic acid formulation as an antimicrobial intervention to reduce levels of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 on external carcass surfaces of hot-boned beef and veal. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 200-203, 2007.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. **Journal of Food Microbiology**, v.113, p.284–288, 2007.

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. **Canadian Journal of Microbiology**, 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 Microbiologica (Praha)**, v. 44, p. 455–456, 1999.

POSSÉ, B.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRIX, M.; HERMAN, L. Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 591-599, 2007.

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

PRAGER, R.; ANNEMULLER, S.; TSCHAPE, H. Diversity of virulence patterns among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases – need for more detailed diagnostics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 29-38, 2005.

ProMED - Program for Monitoring Emerging Diseases, PRO/AH/EDR> *E. coli* O157 - USA (03): (MN), unpasteurized milk. Disponível em <<http://www.promedmail.org>>. Acesso em 02 de junho de 2010a.

ProMED - Program for Monitoring Emerging Diseases, PRO/AH> *E. coli* VTEC non-O157 - USA (06): O145, lettuce. Disponível em <<http://www.promedmail.org>>. Acesso em 02 de junho de 2010b.

PRUIMBOOM-BREES, I., MORGAN, T., ACHERMANN, M.R., DEANNYSTROM, E., SAMUEL, J.E., CORNICK, N.A.; MOON, H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 10325-10329, 2000.

RADU, S.; LING, O.W.; RUSUL, G.; KARIM, M.I.A.; NISHIBUCHI, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD e PFGE analyses. **J. Microbiol. Methods**, v. 46, p. 131-139, 2001.

RAJPURA, A.; LAMDEN, K.; FORSTER, S.; CLARKE, S.; CHEESBROUGH, J.; GORNALL, S.; WATERWORTH, S. Large outbreak of infection with *Escherichia coli* O157 PT21/28 in Ecclestone, Lancashire, due to cross contamination at a butcher's counter. **Communicable Disease and Public Health**, 6:279–284, 2003.

READ, S. C.; GYLES, C. L.; CLARKE, R. C.; LIOR, H.; MCEWEN, S. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. **Epidemiology and Infection**, v. 105, n. 1, p. 11-20, 1990.

REID, C.C.; SMALL, A.; AVERY, S.M.; BUNCIC, S. Presence of food-borne pathogens on cattle hides. **Food Control**, v. 13, n. 6-7, p. 411-415, 2002.

RHOADES, J.R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. **Food Microbiology**, v. 26, p. 357-376, 2009.

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

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

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 681-685, 1983.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; ROLDÁN, C.D.; BALBI, L.; GARCÍA, B.; FIORILLI, G.; SOSA-ESTANI, S.; KINCAID, J.; RANGEL, J.; GRIFFIN, P.M. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 88-96, 2006.

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

ROLDÁN, M.L.; CHINEN, I.; OTERO, J.L.; MILIWEBSKY, E.S.; ALFARO, N.; BURNS, P.; RIVAS, M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 39, p. 113-119, 2007.

SAMADPOUR, M.; KUBLER, M.; BUCK, F.C.; DEPAVIA, G.A.; MAZENGIA, E.; STEWART, J.; YANG, P.; ALFI, D. Prevalence of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle faeces from King County, Washington. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1322-1325, 2002.

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.

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. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 288-293, 2009.

SEKLA, L.; MILLEY, D.; STACKIW, W.; SISLER, J.; DREW, J., & SARGENT, D. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef – Manitoba. **Canadian Diseases Weekly Report**, v.16, n. 22, p. 103-105, 1990.

SHEFER, A.M.; KOO, D.; WERNER, S.B.; MINTZ, E.D.; BARON, R.; WELLS, J.G.; BARRET, T.J.; GINSBERG, M.; BRYANT, R.; ABBOTT, S.; GRIFFIN, P.M. A cluster of *Escherichia coli* O157:H7 infections with the hemolytic uremic syndrome and death in California: a mandate for improved surveillance. **The Western Journal of Medicine**, v. 165, p. 15-19, 1996.

SHEIRING, J.; ANDREOLI, S.P.; ZIMMERHACKL, L.B. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated haemolytic uremic syndrome (HUS). **Pediatric Nephrology**, v. 23, p.1749-1760, 2008.

SHRIVER-LAKE, L.C.; TURNER, S.; TAITT, C.R. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 spiked into food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 66-71, 2007.

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

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, 573p., 1973.

SOFOS, J.N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v.78, p. 3-13, 2008.

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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 223-225, 2007.

STIRLING, A.; MCCARTNEY, G.; AHAMED, S.; COWDEN, J. An outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection in Paisley, Scotland. **Eurosurveillance Bulletin**, v. 12, p. 268-269, 2007.

STRACHAN, N.J.C.; DUNN, G.M.; LOCKING, M.E.; REID, T.M.S.; OGDEN, I.D. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 129-137, 2006.

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

TARAWNEH, K.A.; AL-TAWARAH, N.M.; ABDEL-GHANI, A.H.; AL-MAJALI, A.M.; KHLEIFAT, K.M. Characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolates from faeces of small ruminants and environmental samples in southern Jordan. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 310-317, 2009.

TARR, P.I., TRAN, N.T., WILSON, R.A. *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 133-139, 1999.

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. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 419-425, 2007.

TSAI, H.M. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. **Journal of the American Society of Nephrology**, 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. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 926-941, 2004.

VANSELOW, B.A.; KRAUSE, D.O.; McSWEENEY, C.S. The Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, their ruminant hosts, and potencial on-farm interventions: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, p. 219-244, 2005.

VARELA, G.; CHINEN, I.; GADEA, P.; MILIWEBSKY, E.; MOTA, M.I.; GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, G.; GUGLIADA, M.J.; CARBONARI, C.C.; ALGORTA, G.; BERNADÁ, M.; SABELLI, R.; PARDO, L.; RIVAS, M.; SCHELOTTO, F. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 93-100, 2008.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 237-241, 2007.

VAZ, T.M.I., IRINO, K., KATO, M.A.F.F., DIAS, A.M.G., GOMES, T.A.T., MEDEIROS, M.I.C., GUTH, B.E.C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 902-905, 2004.

VERNOZY-ROZAND, C.; RAY-GUENIOT, S.; RAGOT, C.; BAVAI, C.; MAZUY, C.; MONTET, M.P.; BOUVET, J.; RICHARD, Y. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial mince beef. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 7-11, 2002.

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. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2009.

WARRINER, K.; ALDSWORTH, T.G.; KAUR, S.; DODD, C.E.E. Crosscontamination of carcasses and equipment during pork processing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 169-177, 2002.

WEIL, B.R.; ANDREOLI, S.P.; BILLMIRE, D.F. Bleeding risk for surgical dialysis procedures in children with hemolytic uremic syndrome. **Pediatric Nephrology**, DOI 10.1007/s00467-010-1530-1, 2010.

WELINDER-OLSSON, C.; BADENFORS, M.; CHEASTY, T.; KJELLIN, E.; KAIJSER, B. Genetic Profiling of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 959-964, 2002.

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. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 12, p. 2824-2827, 2006.

WRIGHT, D.J.; CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C.A. Immuno-magnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. **Epidemiology and Infection**, v. 113, p. 31-39, 1994.

XIA, X.; MENG, J.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; BLICKENSTAFF, K.; TRAN, T.; ABBOTT, J.; ZHE, J.; ZHAO, S. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1709-1717, 2010.

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 Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1558-1564, 2001.

ZOJA, C.; BUELLI, S.; MORIGI, M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. **Pediatric Nephrology**, DOI 10.1007/s00467-010-1522-1, 2010.

ANEXOS

Solução tampão (g.L^{-1}) – pH – 7,4

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

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

Solução fosfato salina tamponada (g.L^{-1}) – pH 7,3

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

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