

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Escherichia coli*  
PATOGENICA EM DIVERSAS ETAPAS DO ABATE BOVINO**

**Natália Maramarque Nespolo**

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Escherichia coli*  
PATOGENICA EM DIVERSAS ETAPAS DO ABATE BOVINO**

Natália Maramarque Nespolo

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

**2013**

N462e Nespolo, Natália Maramarque  
Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* patogênica em  
diversas etapas do abate bovino. / Natália Maramarque Nespolo. – –  
Jaboticabal, 2013  
xix, 95 p.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Oswaldo Durival Rossi Júnior

Banca examinadora: Hinig Isa Godoy Vicente, Karina Paes  
Burguer, Luís Augusto do Amaral, Maria Izabel Merino de Medeiros  
Bibliografia

1. Bactérias patogênicas. 2. Carne bovina. 3. Bovino-abate-  
frigorífico. 4. *Escherichia coli*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:576.8:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da  
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de  
Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**NATÁLIA MARAMARQUE NESPOLO** – nascida na cidade de Ribeirão Preto-SP, em 24 de junho de 1983, é Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília – Unimar, Marília-SP, no ano de 2005. Durante o período de graduação realizou diversos estágios, entre eles, na Prefeitura Municipal de Marília participando de campanhas de vacinação antirrábica e ações em Educação em Saúde, e também no Serviço de Inspeção Federal (SIF 421) na Indústria e Comércio de Carnes Minerva Ltda. Após o término do Curso de Graduação realizou estágio junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal, na área de Microbiologia de Alimentos e frequentou o Curso de Capacitação para Médicos Veterinários Responsáveis Técnicos em Estabelecimentos Produtores de Alimentos de Origem Animal, oferecido pela FCAV/UNESP. Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação desta Universidade e obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior, com a dissertação intitulada Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do Estado de São Paulo. Realizou trainee na empresa JBS/SA e em agosto de 2009 iniciou suas atividades no curso de Doutorado, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior.

“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos. Com nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo.”

*Buda*

“Que vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

*Charles Chaplin*

“Se seus sonhos estiverem nas nuvens, não se preocupe, pois eles estão no lugar certo; agora construa os alicerces.”

*Dalai Lama*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e pela oportunidade de aprender durante os anos que a força da fé pode tornar qualquer pensamento em realidade e também que as coisas acontecem no momento exato em que deveriam acontecer.

Aos meus pais, Roberto Aparecido Nespolo e Suely Maramarque Nespolo, pelo amor, amizade, companheirismo, dedicação, atenção, compreensão, apoio incondicional e presença em todos os momentos de minha vida.

A minha irmã, companheira fiel, pessoa maravilhosa que me ensinou muito durante todos esses anos. Obrigada pelo amor, carinho, brincadeiras e apoio que foram imprescindíveis em minha formação pessoal e profissional.

Ao Professor Doutor Oswaldo Durival Rossi Júnior pela confiança, compreensão, incentivo, amizade, orientação durante anos de trabalho e, especialmente, pela oportunidade de ter sido para mim não apenas um professor, mas também um segundo pai.

A minha amiga Dalila Aparecida Rossatelli, uma pessoa maravilhosa colocada por Deus em minha vida, que sempre me ajudou, auxiliou e batalhou para a realização deste trabalho como se fosse seu próprio doutorado. Obrigada pela amizade, paciência, companheirismo e apoio.

A todos os amigos, antigos e recentes, distantes e presentes, que enriquecem a minha vida diariamente. Muito obrigada pela amizade, amor e carinho, a mim dispensados.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo carinho e conhecimentos transmitidos a mim, contribuindo indiretamente com esta tese e diretamente com a minha vida profissional.

Aos técnicos do laboratório, Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibelli Júnior (Diba), meus amigos, companheiros de trabalho que tanto me ajudaram na execução deste projeto.

Ao CNPq e à Capes pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche, respectivamente, concedidas.

## SUMÁRIO

Assunto	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	5
3.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	7
3.2.1. Dados epidemiológicos.....	8
3.2.2. Fatores de virulência.....	12
3.2.1.1. Toxinas Shiga (stx).....	13
3.2.1.2. Êntero-hemolisina (EHEC- <i>hly</i> ).....	14
3.2.1.3. Fatores de adesão.....	15
3.2.3. Resistência a antimicrobianos.....	19
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1. Caracterização da indústria e das amostras estudadas.....	21
4.2. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras.....	22
4.3. Metodologia empregada no isolamento da <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	24
4.3.1. Preparo das amostras e enriquecimento seletivo.....	24
4.3.2. Plaqueamento seletivo, isolamento das colônias e identificação presuntiva de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	25
4.4. Caracterização molecular dos isolados.....	26
4.4.1. Extração do DNA bacteriano.....	27
4.4.2. Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR).....	27
4.4.3. Eletroforese de campo pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE).....	28
4.4.4. Detecção dos fragmentos amplificados.....	28
4.5. Testes de susceptibilidade dos isolados frente à ação de antimicrobianos.....	33
4.6. Análise estatística.....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1. Número de colônias, prevalência e perfil de virulência das amostras.....	35
5.2. Dendrograma.....	61
5.3. Susceptibilidade a antimicrobianos.....	67
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	77
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	79
<b>APÊNDICE</b> .....	94
<b>Apêndice 1.</b> Identificação do animal, da propriedade rural, da cidade e do Estado de origem dos 50 animais amostrados, de janeiro a abril de 2011.	95

## EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Escherichia coli* PATOGENICA EM DIVERSAS ETAPAS DO ABATE BOVINO

**RESUMO** – A *Escherichia coli* O157:H7 é um patógeno emergente, responsável por causar diversos surtos de doenças de origem alimentar no mundo, sendo a ingestão de carne bovina contaminada por conteúdo intestinal dos animais durante as etapas do abate, o principal modo de transmissão da bactéria. Diante do exposto e da escassez de dados sobre a ocorrência do microrganismo no Brasil, foi estudada a presença e a origem ou fonte de contaminação de *E. coli* O157:H7 e de outros sorotipos patogênicos nas etapas do fluxograma de abate, realizada a confirmação sorológica dos sorotipos e de alguns genes de virulência, a possível origem comum dos isolados no matadouro-frigorífico e na carne, e o comportamento frente à ação de antimicrobianos. Foram colhidas 349 amostras de 9 locais e a bactéria foi isolada pela metodologia convencional, utilizando o ágar CT-SMAC, sendo os isolados caracterizados pela PCR. A PFGE foi utilizada na análise do perfil genético de alguns isolados e 15 antimicrobianos foram utilizados no teste de susceptibilidade. Os resultados mostram a presença de *E. coli* O157:H7 em 12,0% dos animais e de *E. coli* não-O157 em 32% deles e em 9,52% das amostras de facas, com destaque para a *E. coli* O26 presente em 8,0% dos animais e nas facas, e a *E. coli* O113 em 2,0% dos animais. Foi observado STEC O157:H7 em 12,0% e EPEC O157:H7 em 6,0% dos animais, STEC O26 em 4,76% das facas, EPEC O26 em 8,0% dos animais e 4,76% das facas, e STEC O113 em 2,0% dos animais, sendo relatada pela primeira vez a presença de STEC O26 sorbitol-negativa. Alta porcentagem de similaridade e um clone de *E. coli* O157:H7 foram encontrados entre amostras de fezes e pele de animais provenientes da mesma fazenda, um clone de *E. coli* O26 na pele de três animais da mesma fazenda e alta porcentagem de similaridade do sorotipo entre isolados de pele, músculo externo da carcaça e água residuária da lavagem de carcaça, e sua presença em facas. Os isolados do sorotipo O157:H7 foram 100,0% sensíveis a tetraciclina, cefepime, cefoxitina, ciprofloxacina e sulfazotrim, 78,85% resistentes a cefalotina e 36,61% a ampicilina, e os isolados de O26 foram 100,0% sensíveis a cefoxitina, cefepime e sulfazotrim, 88,23% resistentes a tetraciclina e cefalotina e 82,35% a ampicilina, sendo ambos sorotipos multirresistentes a até seis antimicrobianos. Conclui-se que há a presença de *E. coli* O157:H7 em matadouro-frigorífico bovino, sendo as fezes e a pele dos animais os pontos de disseminação da bactéria no processo de abate, como também há *E. coli* não-O157. Os isolados apresentaram os principais genes responsáveis por causar patologias severas em humanos e foram multirresistentes a antimicrobianos. A fonte de contaminação de *E. coli* O157:H7 no matadouro-frigorífico foi as fezes dos bovinos e de *E. coli* O26 foi a pele contaminada por conteúdo intestinal, apontando que há a transmissão das bactérias entre os animais e entre as etapas do fluxograma do abate, havendo o risco de contaminação da carne. Por isso, é de extrema importância a implementação de medidas de prevenção eficazes tanto no matadouro-frigorífico, quanto nas fazendas, a fim de impedir que as bactérias cheguem à carne, tornando-se um risco potencial à saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** bactérias patogênicas, carne, O157:H7, O26, O113, EPEC, STEC, frigorífico.



## MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF PATOGENIC *Escherichia coli* IN MANY SLAUGHTERHOUSE STEPS

**ABSTRACT** – *Escherichia coli* O157:H7 is an emergent pathogen responsible to cause several outbreaks of foodborne disease in the world, and the ingestion of the meat contaminated with animal intestinal contents in the slaughterhouse steps is the main way of the bacteria transmission. Given the above and the paucity of data about the microorganism's occurrence in Brazil, the presence and the origin or the source of contamination of *E. coli* O157:H7 and others pathogenic serotypes, was studied in the flowchart steps of slaughterhouse, performed serologic confirmation of serotypes and some virulence genes, a possible common origin of the isolates in the slaughterhouse and in the meat, and the behavior to the antimicrobial action. 349 samples were collected from nine locations and the bacterium was isolated by the conventional method using the CT-SMAC agar, and the isolates were characterized by PCR. PFGE was used to analyze the genetic profile of some isolates and 15 antimicrobial were used in the susceptibility test. The results show the presence of *E. coli* O157: H7 in 12.0% of animals and *E. coli* non-O157 in 32% of them, and in 9.52% of knives samples, especially *E. coli* O26 present in 8.0% of animals and knives, and *E. coli* O113 in 2.0% of animals. STEC O157:H7 was observed in 12.0% and EPEC O157:H7 in 6.0% of animals, STEC O26 in 4.76% knives, EPEC O26 in 8.0% of animals and 4.76% knives, and STEC O113 in 2.0% of animals, being first reported the presence of sorbitol-negative STEC O26. High percentage of similarity and a clone of *E. coli* O157:H7 were found between animal's skin and stool samples from the same farm, a clone of *E. coli* O26 in three animal's skin from the same farm and high percentage of serotype similarity between the isolates from skin, external carcass muscle and wastewater from washing carcass, and its presence in knives. The isolates of serotype O157: H7 were 100.0% susceptible to tetracycline, cefepime, cefoxitin, ciprofloxacin and sulfazotrim, 78.85% resistant to cephalothin and 36.61% to ampicillin, and O26 isolates were sensitive 100.0% cefoxitin, cefepime and sulfazotrim, 88.23% resistant to tetracycline and cephalothin and 82.35% to ampicillin, and both serotypes multiresistant up to six antimicrobials. To concluded, there is *E. coli* O157:H7 in cattle slaughterhouse, and animal's feces and skin the dissemination points of bacteria in the slaughtering process, as there is *E. coli* non-O157. The isolates showed the main genes responsible to cause severe humans pathogenesis and were multiresistant to antibiotics. The source of *E. coli* O157:H7 contamination in slaughterhouse was cattle's feces and of *E. coli* O26 was skin contaminated with intestinal contents, indicating that there is bacteria transmission between animals and between the steps of slaughter flowchart, with the risk of meat contamination. Therefore, it's extremely important to implement effective prevention measures both the slaughterhouse, as the farms, in order to prevent bacteria from reaching the meat and harm the health of the consumer.

**Keywords:** pathogenic bacteria, meat, O157:H7, O26, O113, EPEC, STEC, slaughterhouse.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CH – Colite hemorrágica
- DAEC – *Escherichia coli* Difuso-aderente
- DTA – Doenças transmitidas por alimentos
- EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa
- EHEC – *Escherichia coli* Êntero-hemorrágica
- EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva
- EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica
- ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica
- LEE – ilha de patogenicidade “locus of enterocyte effacement”
- LT – Toxina termolábil
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PFGE – Eletroforese de campo pulsado
- SHU – Síndrome hemolítica-urêmica
- ST – Toxina termoestável
- Stx – Shiga toxina
- STEC – *Escherichia coli* Shiga toxigênica
- TTP – Púrpura trombocitopênica trombótica
- VT – Verotoxinas
- VTEC – *Escherichia coli* Verotoxigênica

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Características dos primers utilizados na PCR.....	29
2. Distribuição de colônias presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7, detectadas por testes bioquímicos, em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	35
3. Distribuição das colônias presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7, isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, segundo os genes de virulência detectados por PCR, estado de São Paulo, 2011.....	36
4. Número de isolados de <i>E. coli</i> O157:H7, segundo o tipo de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino em que foram encontrados e genes de virulência identificados, estado de São Paulo, 2011.....	37
5. Identificação das <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, em relação a patotipo, sorotipo, tipo de amostra, tempo de incubação na fase de enriquecimento seletivo e genes de virulência, estado de São Paulo, 2011.....	38
6. Sorotipos de <i>E. coli</i> não-O157 isolados de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, tipo de amostra, sua identificação e genes de virulência identificados, estado de São Paulo, 2011.....	39
7. Identificação de isolados de <i>E. coli</i> O26 e dos genes de virulência, por meio da PCR, em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	42
8. Prevalência de <i>E. coli</i> O157:H7, O26 e O113 em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	44
9. Distribuição de genes de virulência identificados por PCR em <i>E. coli</i> patogênicas, isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	46
10. Identificação dos isolados de <i>E. coli</i> O157:H7 de acordo com patotipo, sorotipo, propriedade rural, número de isolados, perfil de virulência e tipo de amostra colhida no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	52

11. Identificação dos isolados de *E. coli* O26 de acordo com patotipo, sorotipo, propriedade rural, número de isolados, perfil de virulência e tipo de amostra colhida no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011..... 52
12. Identificação de *E. coli* patogênicas, isoladas em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, de acordo com a propriedade rural, cidade, estado, patotipo e sorotipo, estado de São Paulo, 2011..... 57

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR dos primers O157. Controle positivo (CP) EDL 933, controle negativo (CN) água e marcador molecular (MM) de 100 pb (Invitrogen®).....	32
2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR dos primers H7. Controle positivo (CP) EDL 933, controle negativo (CN) água e marcador molecular (MM) de 100 pb (Invitrogen®).....	32
3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR multiplex dos primers <i>eae</i> , <i>stx1</i> e <i>stx2</i> . Controle positivo (CP) EDL 933, controle negativo (CN) água e marcador molecular (MM) de 100 pb (Invitrogen®).....	32
4. Análise da PFGE dos isolados de <i>E. coli</i> O157:H7 provenientes de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	63
5. Análise da PFGE dos isolados de <i>E. coli</i> O26 provenientes das amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	64
6. Perfil de resistência a antimicrobianos de <i>E. coli</i> O157:H7 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	68
7. Perfil de multirresistência a antimicrobianos de <i>E. coli</i> O157:H7 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	69
8. Perfil de resistência a antimicrobianos de <i>E. coli</i> O26 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	71
9. Perfil de multirresistência a antimicrobianos de <i>E. coli</i> O26 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.....	72

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento em número e severidade de surtos relacionados às doenças de origem alimentar ao redor do mundo têm contribuído para o aumento da preocupação pública com a segurança do consumo da carne e seus derivados. A carne é um alimento altamente perecível que, se não for obtido, processado, embalado, armazenado e distribuído adequadamente, pode deteriorar-se rapidamente e tornar-se um alimento perigoso à saúde humana devido à multiplicação bacteriana, além de atuar como um veículo na transmissão de patógenos.

As boas práticas de higiene são importantes para a prevenção da contaminação das carcaças por microrganismos patogênicos causadores de inúmeras doenças. Os animais são reservatórios naturais específicos de alguns patógenos, como *Escherichia coli* produtora da toxina shiga (STEC), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* sp., que podem ser transmitidos pelo consumo da carne e causar danos à saúde do ser humano, ocasionando desde simples gastroenterites até o óbito.

Entre as bactérias patogênicas encontra-se a *Escherichia coli*, que faz parte da microbiota normal do intestino de mamíferos, principalmente dos bovinos. Um dos sorotipos mais importantes é *E. coli* O157:H7, cujo principal modo de transmissão se dá pelo consumo de alimentos de origem bovina, principalmente a carne que pode ser contaminada durante o abate ou o processamento inadequado, quando as bactérias intestinais presentes nas fezes contaminam a carcaça.

Embora as graves doenças humanas associadas à *E. coli* O157:H7 tenham sido pouco descritas no Brasil, diversos estudos em diferentes partes do mundo já identificaram essa bactéria associada a surtos de doenças de origem alimentar e a rebanhos bovinos. Sendo assim, estudos epidemiológicos nos abatedouros são de extrema importância, a fim de verificar a presença da bactéria e também sua origem ou fonte de contaminação nas diversas etapas do fluxograma de abate, contribuindo para diminuir e prevenir a contaminação da carne comercializada.

## 2. OBJETIVOS

Diante da importância da carne bovina e seus produtos na alimentação da população, da escassez de dados no Brasil a respeito da *E. coli* O157:H7 e da importância de descobrir a(s) fonte(s) de origem dessa bactéria para o ambiente industrial é que se propôs a realização do presente estudo, tendo por objetivos:

- Determinar, durante o processo de abate bovino, em estabelecimento exportador, a ocorrência, as possíveis fontes de contaminação da carne por *E. coli* O157:H7 e as possíveis formas de disseminação desse microrganismo;
- Realizar a confirmação sorológica de *E. coli* O157:H7 e de outros sorotipos patogênicos;
- Caracterizar o perfil de virulência de isolados de *E. coli* patogênicas identificando os principais genes;
- Definir a possível origem da *E. coli* O157:H7 isolada nos diferentes pontos do abate e nas carnes;
- Verificar o comportamento de isolados de *E. coli* patogênicas frente à ação de antimicrobianos de uso comum;

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

No período de 1970 a 2010, houve um crescimento do rebanho bovino brasileiro de 87.005.812 cabeças para 205.260.154 cabeças (IBGE, 2013). Paralelamente, houve o aumento na produção de carne bovina, que passou de 2.024.540 toneladas no ano de 1974 para 7.196.140 toneladas no ano de 2010, deixando o país em segundo lugar no ranking mundial de produção, perdendo apenas para os Estados Unidos, que produziram 11.219.000 toneladas em 2010 (FAO, 2013). É importante frisar que no período de 1974 a 2010 houve um incremento de mais de 200% na produção de carne bovina brasileira, enquanto nos Estados Unidos este aumento foi inferior a 10%.

Entre os alimentos produzidos no Brasil, incluindo os de origem vegetal, a carne bovina ocupa o primeiro lugar (FAO, 2013). Com o aumento na produção, também houve um aumento no consumo deste tipo de carne entre os brasileiros. Este consumo foi de 7.065.504 toneladas no ano de 2007, enquanto no mesmo ano o consumo de carne de frango foi de 6.018.529 toneladas e o de carne suína de 2.092.938 toneladas (FAO, 2012).

Os produtos de origem animal, em especial a carne bovina, são facilmente contaminados durante e após o abate, e a colonização dos tecidos por microrganismos deteriorantes e patogênicos se dá principalmente durante a sangria, a esfola, a evisceração, o corte e a desossa (FRANCO e LANDGRAF, 1996; ARTHUR et al., 2007).

A deterioração da carne é facilitada pela sua composição proteica, um meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano, aliada à alta atividade de água, à presença de substâncias nitrogenadas e minerais, e a um pH favorável à maioria dos microrganismos (BORGES e FREITAS, 2002).

A qualidade e a segurança microbiológica de produtos "in natura" dependem do controle desenvolvido durante a produção, a preparação, o armazenamento e a apresentação para a comercialização. Entre as fontes de contaminação da carne está o próprio animal, que pode contribuir com microrganismos, e também outras fontes, como água, instalações, equipamentos e manipuladores (BRASIL, 2005b; THOMAS et al., 2012).



Tompkin et al. (2001) relataram que a população microbiana superficial de carcaças recém-abatidas encontrava-se entre  $10^2$  e  $10^3$  bactérias/cm<sup>2</sup>, sendo encontradas, preferencialmente, bactérias mesófilas originárias do trato gastrointestinal e da superfície externa (pele) dos animais.

O conhecimento das prováveis fontes de contaminação e dos diferentes meios de difusão é importante para que seu controle seja maximizado e os microrganismos patogênicos sejam excluídos sempre que possível (FRANCO e LANDGRAF, 1996; ELDER et al., 2000).

Arthur et al. (2002) mostraram que estratégias de intervenção usadas durante o processamento na indústria frigorífica, diminuíram a contaminação das carcaças por STEC, entre os processos de pré-evisceração e pós-processamento.

Um estudo realizado com produtos mantidos a 18°C e prontos para consumo, vendidos em Taiwan, mostrou a contaminação de amostras de carne por algumas bactérias. Dentre as 44 amostras analisadas, 4,5% apresentavam *E. coli*, 15,4% *S. aureus*, 43,2% *Pseudomonas* sp. e 62,5% *Bacillus cereus* (FANG et al., 2003).

No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, de 3.421 surtos de doenças veiculadas por alimentos durante o período de 2000 a 2011, 358 (10,47%) foram causados por consumo de carnes vermelhas, sendo a maioria deles a partir de carnes preparadas em residências, seguidas daquelas preparadas em restaurantes (BRASIL, 2011).

Pizzolitto (2007), analisando 431 surtos de doenças diarreicas agudas em núcleos receptores turísticos no Estado de São Paulo, verificou que as bactérias apareceram em segundo lugar (72,72%) entre os agentes etiológicos mais frequentes, sendo 28,38% coliformes, 13,55% *Salmonella* spp., 10,71% *Escherichia coli*, 7,77% *Shigella* sp., 4,99% *Staphylococcus aureus*, 2,91% *Cryptosporidium*, 2,64% *Clostridium* sp., 2,02% *Bacillus cereus* e 0,05% *Campylobacter* sp. A carne vermelha foi um dos três alimentos mais associados às doenças transmitidas por alimentos (DTA), estando presente em 12% dos casos.

Muitas enfermidades de origem alimentar são atribuídas ao consumo de carne contaminada por microrganismos patogênicos. Entre eles pode-se destacar um patógeno emergente, a *Escherichia coli* O157:H7 (ARMSTRONG et al., 1996; SASAKI et al., 2011).

### 3.1. *Escherichia coli*

Em 1885, Theodor von Escherich (1857-1911), pediatra alemão, descreveu organismos microscópicos isolados de fezes de neonatos humanos, que denominou de *Bacterium coli commune*, hoje conhecidas e classificadas como *Escherichia coli* (ORSKOV e ORSKOV, 1985).

O gênero *Escherichia* contém seis espécies, *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. blattae*. A mais comum é a *Escherichia coli*, sendo a espécie comensal predominante na microbiota anaeróbia facultativa do trato intestinal dos humanos e dos animais homeotermos.

A *Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae. É um bastonete Gram-negativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, anaeróbio facultativo e fermentador da lactose. É um mesófilo típico que se multiplica em temperaturas de 7°C a 48°C, com temperatura ótima de 37°C, e em pH próximo ao neutro (VARNAM e EVANS, 1991; SILVA et al., 1997). Também é um microrganismo que beneficia seu hospedeiro, pois produz vitamina K e impede o desenvolvimento de bactérias patogênicas no intestino (FDA, 2008).

É classificada sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base nos antígenos O, ou somáticos, e flagelares, ou H, respectivamente. Ainda, a bactéria pode expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogênese (CAMPOS et al., 2004).

As linhagens de *E. coli* patogênicas são classificadas de acordo com sua ação no hospedeiro, podendo ser enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), êntero-hemorrágicas ou produtoras de verotoxina (EHEC ou VTEC), enteroagregativas (EAEC) e difuso-aderentes (DAEC) (KAPER et al., 2004).

As enteropatogênicas (EPEC) são responsáveis pelos casos de diarreia infantil e os casos em adultos geralmente são decorrentes de doses infectantes altas. O mecanismo de patogenicidade está relacionado à aderência da bactéria na membrana da célula epitelial, invasão por processo endocítico e destruição das vilosidades intestinais, com perda do equilíbrio eletrolítico (VARNAM e EVANS, 1991; NATARO e KAPER, 1998).

*E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são produtoras de toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). Foram encontradas primeiramente em suínos jovens e acometem animais, crianças e adultos. A bactéria coloniza a superfície da mucosa intestinal, resiste aos movimentos peristálticos e elabora enterotoxinas que são colocadas para dentro das células através de processo de transporte vesicular chamado trans-Golgi. É o agente causal da diarreia aquosa e nos países em desenvolvimento é conhecida como “diarreia dos viajantes” (SILVA et al., 1997; NATARO e KAPER, 1998).

As cepas enteroinvasivas (EIEC) aderem à mucosa do intestino grosso, penetram nas células epiteliais, lisam o vacúolo endocítico, realizam a multiplicação intracelular e espalham-se para as células epiteliais adjacentes. Quando a infecção é severa, causa forte reação inflamatória pela destruição dos tecidos, promovendo diarreia aquosa com sangue e muco (NATARO e KAPER, 1998).

As enteroagregativas (EAEC) são designadas pela aderência às células HEp-2 do tipo agregativa, provocando diarreia persistente em crianças com muco e sangue (NATARO e KAPER, 1998).

As difuso-aderentes (DAEC) provocam diarreia com ou sem sangue e são identificadas pela característica de aderir difusamente às células HEp-2 ou HeLa. Este tipo cobre a célula uniformemente e geralmente não produz toxinas termoestáveis e termolábeis, como também não possui fatores de aderência como plasmídios (DOYLE et al., 1997).

As êntero-hemorrágicas (EHEC) provocam lesões por adesão às células do hospedeiro, mesmo quando em pequeno número, promovem diarreia sanguinolenta, com baixo aumento de temperatura ou ausência de febre. São associadas à colite hemorrágica (CH) e, em casos mais graves, à Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU), que pode levar à falência renal e também à Púrpura Trombocitopênica Trombótica (TTP), com possível envolvimento do sistema nervoso central (SILVA et al., 1997; KAPER et al., 2004).

Esse último grupo produz citotoxinas como as verotoxinas (VT), cuja atividade tóxica se dá em células Vero, produz as toxinas do tipo Shiga (“Shiga-like” - stx), similares à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I, fatores de virulência comuns entre as síndromes e responsáveis pela destruição dos tecidos do intestino

e do rim. Assim, as cepas EHEC também são chamadas de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou produtora de toxina Shiga (STEC) (VARNAM e EVANS, 1991; NATARO e KAPER, 1998; BERTÃO e SARIDAKIS, 2007).

Todas as EHEC são consideradas patogênicas, pois são correlacionadas a sintomas clínicos específicos, enquanto que nem todas as STEC são patogênicas aos seres humanos. Isso mostra que a infecção dos humanos por STEC é limitada pelos sorotipos O:H, como a *E. coli* O157:H7, a O26, a O111:H<sup>-</sup> e a O103:H2 que foram isoladas de surtos de doença de origem alimentar, casos de diarreia e SHU (MATHUSA et al., 2010; GRANT et al., 2011)

Diversos sorotipos foram encontrados em rebanhos bovinos, em surtos de doenças de origem alimentar e em doenças severas em humanos (BETTELHEIM, 1978; CONSTANTINIU, 2002; IRINO et al., 2005; DIARRA et al., 2009; MANNA et al., 2010; O'REILLY et al., 2010; KAPPELI et al., 2011; BUVENS et al., 2012; CHASE-TOPPING et al., 2012; PADDOCK et al., 2012). Porém, o sorotipo mais estudado é o O157:H7 e também é o mais frequentemente associado a surtos de doenças de origem alimentar (VARNAM e EVANS, 1991; HANCOCK et al., 1997; CONSTANTINIU, 2002; MENG et al., 2007; BERTÃO e SARIDAKIS, 2007; SHAH et al., 2010; THOMAS et al., 2012).

### **3. 2. *Escherichia coli* O157:H7**

Diferentemente das outras *E. coli*, a O157:H7 não fermenta o sorbitol, não produz a enzima  $\beta$ -glicuronidase, tem desenvolvimento pobre ou nulo a 44°C, descarboxila a lisina e a ornitina e não fermenta a rafinose e o dulcitol (SILVA et al., 1997; COIA, 1998; APHA, 2001). Pode sobreviver sob temperaturas de refrigeração e congelamento, porém não tolera o calor, sendo rapidamente destruída pelos procedimentos normais de cocção e pasteurização (DOYLE e SCHOENI, 1984; COIA, 1998).

O grupo da O157:H7 também é mais tolerante à acidez do que outras *E. coli*, fato importante para sobrevivência em produtos cárneos fermentados ou em cidras de maçã não fermentadas que foram associados a surtos de doenças de origem alimentar na América do Norte (BOYSE et al., 1997; COIA, 1998).

*E. coli* O157:H7 pode causar diarreia em animais jovens, que, quando se recuperam, tornam-se saudáveis, mas portadores de STEC O157:H7 (VERWEYEN et. al., 2000).

Já, nos seres humanos, pode causar diarreia sem sangue, colite hemorrágica e SHU, sendo o período de incubação após a ingestão da bactéria de três a quatro dias, quando ocorre sua colonização no intestino grosso. A doença começa com uma diarreia e dores abdominais severas durante um ou dois dias e progride no segundo ou terceiro dia para uma diarreia sanguinolenta, que perdura por quatro a dez dias. Os sintomas geralmente desaparecem em uma semana, mas em 6% das pessoas progride para SHU, um quarto destas necessita de diálise e 75% das pessoas que fazem diálise necessitam de transfusão de sangue (MENG et al., 2007).

O quadro de SHU pode se agravar devido ao envolvimento do sistema nervoso, manifestando a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (TTP) e em ambos os casos pode afetar órgãos como cérebro, coração e pâncreas, com consequente encefalopatia, cardiomiopatia e diabetes mellitus. A taxa de casos fatais de infecção por *E. coli* O157:H7 é cerca de 1% e cerca de 5% para as pessoas com SHU na fase aguda da doença (COIA, 1998; MENG et al., 2007).

Buven et al. (2012), estudando as *E. coli* produtoras de toxina shiga (STEC) em casos de infecções na Bélgica, descobriram que a STEC O157 e a O26 estão mais relacionadas (58,3% e 12,5% respectivamente) com SHU e diarreia com sangue que outros sintomas (16,9% e 25,9% respectivamente).

### **3.2.1. Dados Epidemiológicos**

Dados epidemiológicos americanos sobre surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) durante o ano de 2008 revelaram que *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) causou 17% dos surtos de DTA relacionados a hospitalizações, sendo 7,78% dessas doenças causadas pelo sorogrupo O157. Ainda, 20 das 22 mortes relatadas foram atribuídas a bactérias, sendo 13 causadas por *Salmonella*, três por *Listeria monocytogenes*, duas por *E. coli* O157:H7, uma por *E. coli* O111 e uma por *Staphylococcus* (CDC, 2008).

Diversos surtos de doenças de origem alimentar, causados pela *E. coli* O157:H7, foram relatados nos Estados Unidos. Em 1983, houve o primeiro relato de um surto de diarreia sanguinolenta ligado ao consumo de hambúrgueres contaminados e mal cozidos (RILEY et al., 1983).

No ano de 2005, três surtos ocorreram acometendo pessoas que tiveram contato direto com os animais de exposição, entre eles bovinos, durante uma visita totalizando 173 casos, com 22 casos de Síndrome Urêmica Hemolítica (SHU). Nenhum alimento específico, bebidas ou exposição à água de recreação foram associados à doença, apenas o contato direto com os animais e o ambiente em que eles se encontravam, indicando a necessidade de medidas de controle para reduzir a transmissão da bactéria dos animais para os seres humanos (CDC, 2005).

Em 2007, outro surto ocorreu pela ingestão de pizza congelada contendo pepperoni que resultou em oito pessoas hospitalizadas e quatro com SHU. Em 2008, um surto se deu devido ao consumo de carne comprada na casa de carnes Kroger em Michigan e Ohio, resultando em 45 casos confirmados, com 23 hospitalizações e um caso de SHU. Em 2009, 2010, 2011 e 2012 também houve surtos relacionados à carne bovina, queijos e frango, legume e salame, e espinafre, respectivamente (CDC, 2013).

O Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos coloca a *E. coli* O157:H7 em segundo lugar como patógeno que mais causa diarreia nos Estados Noroeste do Pacífico, perdendo apenas para a *Salmonella* spp. (FDA, 2008), e em quinto lugar como patógeno que mais causa hospitalização em casos de doenças transmitidas por alimentos (CDC, 2011).

Segundo o Centro de Controle de Doenças (CDC, 2008), os dados epidemiológicos e investigativos servem para capacitar os estados e a federação para identificarem as causas dessas doenças e permitir a implementação de medidas de controle.

A maioria dos surtos de infecções humanas causadas por estas bactérias deve-se ao consumo de carne bovina mal cozida, de leite de vaca não pasteurizado e águas de abastecimento contaminadas pelo conteúdo intestinal de animais. Entre os alimentos, a carne bovina é uma das fontes potenciais de *E. coli* O157:H7, pois a contaminação se dá na hora do abate, se houver contato da carne com vísceras e



superfície da planta de processamento contaminadas com conteúdo intestinal dos animais (SILVA et al., 1997; CONSTANTINI, 2002; FDA, 2008).

*E. coli* pode sobreviver no solo, na água contaminada e em material em decomposição (SILVA et al., 1997; FERENS e HOVDE, 2011). Vários animais podem servir como reservatório de STEC, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, cães, gatos e aves. O bovino é o principal deles, eliminando-a por meio de suas fezes, que de maneira direta ou indireta atingem a cadeia alimentar dos seres humanos. Estes podem ser infectados ao ingerir água, vegetais ou alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne bovina, o que tornou a *E. coli* O157:H7 objeto de estudos na medicina humana, veterinária e na biologia molecular (NATARO e KAPER, 1998; CUTTER e RIVERA-BETANCOURT, 2000; HORNYTZKY et al., 2005; MAINIL e DAUBE, 2005; MONAGHAN et al., 2011).

As principais características epidemiológicas de EHEC incluem os animais como reservatório da bactéria no trato gastrointestinal, a transmissão por vários tipos de alimentos, com destaque para a carne bovina, e a baixa dose infectante da bactéria (NATARO e KAPER, 1998; HUSSEIN, 2007).

A marcada patogenicidade do sorotipo O157:H7 é uma evidência epidemiológica de que apenas algumas células são necessárias para causar a doença em humanos (GRIFFIN e TAUXE, 1991).

A exata dose infectante é ainda desconhecida, mas, através da compilação de dados de surtos investigativos nos Estados Unidos, parece encontrar-se na faixa de 10 células por grama ou mililitro do alimento consumido (WAHLSTRÖM, 2001; MENG et al., 2007; FDA, 2008). O regulamento do Serviço de Inspeção de Segurança Alimentar dos EUA declara que a presença de uma unidade formadora de colônia de *E. coli* O157:H7 em 25 gramas constitui uma carne bovina com risco à saúde pública (JOHNSON et al., 1996; COIA, 1998).

Os patógenos podem ser transmitidos à carne por diversas maneiras, como no processo de remoção da pele do animal, que pode transferir as bactérias para a carcaça, facas usadas na retirada da pele, equipamentos ou mãos dos manipuladores durante o processo de remoção (THOMAS et al., 2012).

Um estudo realizado na Índia durante 10 anos sobre a prevalência e a distribuição geográfica de *E. coli* O157 identificou a bactéria em 13 (0,9%) de 1.376

amostras de carne, 10 (1,8%) de 553 amostras de leite, 8 (1,6%) de 486 amostras de água e 61 (3,3%) de 1.828 amostras de fezes de bovinos (SEHGAL et al., 2008).

No Brasil, o primeiro relato da bactéria em gado leiteiro foi dado por Cerqueira et al. (1999), que analisaram gado leiteiro e de corte no Estado do Rio de Janeiro e verificaram uma alta ocorrência (71%) dos genes *stx* detectados por PCR, sendo 1,5% dos isolados *E. coli* O157:H7.

Elder et al. (2000), analisando gado de corte em frigoríficos nos EUA, antes e após o abate, isolaram *E. coli* O157:H7 em 28% das amostras de fezes, 11% das de pele, em 43% das carcaças antes da evisceração, 18% pós-evisceração e 2% após a lavagem e prontas para o resfriamento.

A prevalência e a distribuição de *E. coli* O157:H7 em um frigorífico bovino Iraniano foram estudadas e os autores relataram a presença da bactéria durante a retirada da pele dos animais, em diversos pontos nas carcaças e nas fezes. Ainda, observaram que a contaminação entre carcaças pode ocorrer na linha de produção, pois encontraram a bactéria contendo as mesmas características genotípicas e de virulência em amostras de fezes de um animal e sua respectiva carcaça, e na carcaça adjacente, concluindo que ocorre contaminação durante as etapas de produção da carne (McEVOY et al., 2003).

Omisakin et al. (2003) avaliaram a população de *E. coli* O157 nas fezes de bovinos durante o abate e verificaram a presença da bactéria em 9% de 589 amostras, com concentrações acima de  $10^4$  UFC/g, concluindo pelo alto risco de contaminação do ambiente de abate e também da carne durante o processamento no frigorífico.

Sasaki et al. (2011) sugeriram que a maioria das STEC O157 e O26, contendo os genes *stx*, *eae* e EHEC – *hlyA*, provenientes de gado de corte, eram patogênicas para os humanos e que a redução das populações das bactérias é importante para prevenir surtos de origem alimentar causados por elas.

Para auxiliar o entendimento e o controle dos surtos de doenças, tanto nos hospitais, quanto nas comunidades e na área de segurança alimentar, a técnica mais utilizada, considerada padrão ouro na epidemiologia molecular, é a Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) (TENOVER et al., 1995; HAHM et al., 2003; McLELLAN et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2005; GANDRA et al., 2008).



A Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) é uma técnica bastante complexa, com um poder discriminatório muito elevado, permitindo relacionar epidemiologicamente e geneticamente, os isolados coletados em um surto de uma doença, porém os métodos de tipagem não substituem os dados epidemiológicos, somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas (TENOVER et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2005).

Diante do exposto e tendo em vista os poucos relatos de doenças humanas ocasionadas por STEC no Brasil, a presença de *E. coli* O157:H7 em alguns animais do rebanho bovino e a proximidade do país com a Argentina, onde a SHU é endêmica, torna-se necessária a adoção de medidas preventivas na contaminação dos produtos cárneos pela bactéria (OMISAKIN et al., 2003; BERTÃO e SARIDAKIS, 2007).

### **3.2.2. Fatores de virulência**

Significantes fatores de virulência associados com a patogenicidade de EHEC vêm sendo identificados com base na histopatologia dos tecidos de pacientes com SHU e colite hemorrágica, em estudos com culturas celulares, modelos animais e em estudos utilizando a genética (MENG et al., 2007). A aderência às células da mucosa intestinal e a produção de toxinas são os principais fatores de virulência bacterianos apresentados pelo sorotipo O157:H7 (GRIFFIN e TAUXE, 1991).

A EHEC, além de caracterizar cepas de STEC, causa uma lesão histopatológica na mucosa intestinal denominada “attaching and effacing” – A/E (“attaching” indica uma íntima adesão da bactéria à superfície do enterócito e “effacing” o desaparecimento localizado das microvilosidades da borda em escova), uma propriedade codificada na ilha de patogenicidade chamada “locus of enterocyte effacement” (LEE). LEE também codifica o gene *eae*, que coordena a produção de intimina, responsável pela íntima adesão da bactéria às células epiteliais antes de causar a lesão histopatológica. As cepas de STEC também são denominadas EHEC LEE-negativas ou *eae*-negativas, e as STEC que possuem *eae* são denominadas EHEC LEE-positivas (PATON e PATON, 2002; LUCK et al., 2005; MAINIL e DAUBE, 2005).

Além da produção de uma ou mais toxinas Shiga, outros fatores são considerados relevantes para ocasionar doença, como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a êntero-hemolisina (EHEC-*hly*) e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998a; PATON e PATON, 2002).

### 3.2.2.1. Toxinas Shiga (stx)

Consideradas os principais fatores de virulência de cepas STEC, as toxinas Shiga são divididas em duas classes, stx1 e stx2. A stx1 é 98% homóloga em estrutura biológica com a toxina stx1 produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 e a stx2 é 60% homóloga à toxina stx1, ambas produzidas pela *E. coli*, porém elas são antigenicamente distintas, ou seja, stx1 é semelhante à toxina Shiga, enquanto stx2 é uma variante (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998a).

As toxinas Shiga são codificadas por fagos inseridos no cromossomo da *E. coli* e são formadas por uma estrutura básica de subunidade A-B. A subunidade A (32 kDa), que possui atividade enzimática, é ligada ao pentâmero da subunidade B (7,7 kDa). As células eucarióticas contêm um glicolípido chamado globotriasilceramida (Gb3), que atua como um receptor para as stxs, levando as toxinas para dentro da célula por endocitose. As toxinas são então transportadas para o retículo endoplasmático, onde inibem a síntese proteica por prevenir a ligação do aminoacetil tRNA ao ribossomo, causando a morte celular (JENKINS et al., 2008; MATHUSA et al., 2010).

Outras diferenças foram observadas entre stx1 e stx2, como a afinidade pelo receptor em comum Gb3. Stx1 possui uma afinidade cerca de 10 vezes maior por Gb3, se comparado a stx2, e estudos mostraram uma velocidade de dissociação maior entre Gb3 e stx2 do que stx1. Sendo assim, a ligação e a dissociação entre o receptor e stx2 ocorre mais lentamente. Essas características podem explicar a maior associação de danos vasculares causados por stx2, quando comparados aos danos causados por stx1 (BERTÃO e SARIDAKIS, 2007; DOYLE et al., 1997; NATARO e KAPER, 1998, FULLER et al., 2011).

A *stx1* e suas variantes apresentam poucas diferenças nas suas sequências genéticas, sem maiores consequências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas. As variantes de *stx1* descritas são a *stx1c*, *stx1OX3* e *stx1d*, encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de humanos, ovinos e bovinos, respectivamente. Cinco variantes biológicas de *stx2* foram descritas, a *stx2a*, *stx2c*, *stx2d* e *stx2f* isoladas de humanos e *stx2e* isolada de suínos, todas diferindo entre si por suas antigenidades, toxicidades e sequências genéticas. A diferença entre os tipos de toxina foi definida de acordo com a toxicidade, o receptor de toxina e a composição de aminoácido das subunidades de *stxA* e *stxB* (DOYLE et al., 1997; NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998b).

As *stx* são produzidas no cólon e, por meio da corrente sanguínea, são levadas aos rins, causando danos ao endotélio vascular e oclusão dos microvasos, através de uma combinação de toxicidade direta e indução da inflamação local, os quais podem levar à SHU. Também podem levar à apoptose de células epiteliais intestinais e mediar o dano local do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal (ANDREOLI et al., 2002; KAPER et al., 2004; BERTÃO e SARIDAKIS, 2007).

Diversos estudos mostraram que a presença de *stx2* está relacionada com a severidade de doenças em humanos, incluindo o desenvolvimento de SHU e diarreia com sangue, e que a presença dessa toxina associada a intimina facilita a adesão da bactéria nas células, colaborando com a gravidade da doença (BEUTIN et al., 1998; BOERLIN et al., 1999; FRIEDRICH et al., 2002; FULLER et al., 2011). Contudo, Paton et al. (1999) relataram que cepas de STEC *eae*-negativas foram responsáveis por causar SHU em humanos.

Boerlin et al. (1999) mostraram uma forte associação entre *stx2* e doenças severas, mostrando que isolados positivos para *stx2* foram cinco vezes mais associados com doenças severas que isolados *stx2* negativos pertencentes ao mesmo sorotipo.

### **3.2.2.2. Êntero-hemolisina (EHEC-*hly*)**

Estudos observaram que cerca de 89% de cepas STEC apresentavam um fenótipo hemolítico diferente do padrão conhecido e associado à alfa-hemolisina de *E. coli* (*hly*), sendo estas cepas denominadas êntero-hemolíticas (*Ehly*). Enquanto a

alfa-hemolisina é codificada por genes cromossomais, os genes que codificam a êntero-hemolisina foram descritos no plasmídeo pO157, de 60 MDa, na cepa padrão EDL 933 do CDC dos Estados Unidos (SCHMIDT et al., 1994). As êntero-hemolisinas são divididas geneticamente em dois grupos distintos, cuja patogenicidade não foi bem esclarecida (NATARO e KAPER, 1998).

Embora a êntero-hemolisina esteja presente na maioria dos isolados de EHEC/STEC e a êntero-hemólise sugerida como um marcador para detecção de EHEC, sua contribuição na patogenicidade ainda não foi esclarecida. Sugeriu-se que a lise de eritrócitos pode fornecer ferro e estimular o desenvolvimento de STEC. A presença de EHEC-*hly* também parece estar envolvida com a severidade da doença em humanos (SCHMIDT et al., 1994). O plasmídeo pO157 está presente também em cepas do sorotipo O26:H11 e na maioria de STEC isoladas de humanos, e seus genes codificam outros possíveis marcadores de virulência adicionais: uma catalase-peroxidase (KatP) e uma serina protease (EspP), capaz de clivar o fator V de coagulação humano e de exacerbar a doença hemorrágica (BRUNDER et al., 1996; NATARO e KAPER, 1998; CAPRIOLI et al., 2005).

### 3.2.2.3. Fatores de Adesão

#### Intimina

Assim como em EPEC, em EHEC outros fatores de virulência estão localizados no cromossomo em LEE, cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E. Essa lesão é caracterizada pela degeneração localizada das microvilosidades epiteliais intestinais e a montagem de estruturas semelhantes a pedestais, constituídas de filamentos de actina, formadas nos locais onde há bactérias aderidas (BEAUDRY et al., 1996; NATARO e KAPER, 1998; CAPRIOLI et al., 2005).

A região LEE codifica uma proteína da membrana externa não fimbrial de 94 kDa, a intimina (*ea $\epsilon$* ); um sistema de secreção do tipo III (proteínas Esc e Sep); chaperoninas (proteínas Ces); proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e proteínas efetoras (EspF, EspG e Map), assim como o receptor para intimina (Tir).

A intimina é fator-chave de colonização para EHEC em ovinos e bovinos recém-nascidos e adultos, e parece ser a única adesina de *E. coli* O157:H7 cujo papel na colonização do epitélio intestinal foi demonstrado em modelos animais. No entanto, mutantes intimina-negativos ainda são capazes de colonizar certos locais do trato gastrintestinal dos ruminantes, e isso indica que outros fatores de colonização podem estar presentes (DOYLE et al., 1997; NATARO e KAPER, 1998; VAN DIEMEN et al., 2005).

Em humanos, STEC *eae*-positiva está relacionada a quadros severos de diarreia, principalmente HC e SHU (PATON e PATON, 1998a; BEUTIN et al., 1998; BOERLIN et al., 1999). A *E. coli stx*-negativa que possui genes que codificam a intimina (*eae*) e a êntero-hemolisina (EHEC-*hlyA*) são consideradas *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), e apesar de não apresentarem o gene *stx*, elas não devem ser negligenciadas, uma vez que foram isoladas de pacientes com diarreia, CH e SHU (KARCH et al., 1992; SCHMIDT et al., 1999; FENG et al., 2001; JORIS et al., 2011). Ainda, Beutin et al. (1998) descreveram que STEC *eae*-negativas foram encontradas em 39,3% dos pacientes, sendo a maioria deles associados a casos clínicos menos severos, sem complicações.

A região 5' do gene *eae* é conservada, enquanto a região 3' é heterogênea. Esta observação tornou possível a confecção de oligonucleotídios iniciadores universais e aleloespecíficos para o ensaio de PCR, permitindo, assim, a diferenciação de 15 variantes de *eae*, que codificam 15 diferentes tipos e subtipos de intimina:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2/\theta$ ,  $\delta/\kappa, \epsilon, \zeta, \eta, \iota, \lambda, \mu, \nu$ , e  $\xi$  (BLANCO et al., 2004).

### **Porcine Attaching and Effacing Associated – *paa* (Adesão e Esfacelamento Associados a Suínos)**

O gene *paa* é codificado por uma proteína de 27,6 kDa e é importante para a atividade de A/E de EPEC, porém sua patogenicidade não foi completamente elucidada. An et al. (1999) examinaram a presença do gene *paa* e *eae* em *E. coli* isoladas de humanos e animais, e encontraram uma forte correlação entre a presença do gene *paa* detectada em EHEC O157:H7 e O26, e isolados *eae*

positivos, sugerindo que o gene *paa* pode desempenhar papel importante no mecanismo de A/E e outros mecanismos de doenças entéricas.

### **Ferric enterobactin transport ATP-binding protein – *fepC* (proteína de ligação ATP transportadora da enterobactina férrica)**

A ilha associada à patogenicidade (PAI<sub>ctf073</sub>) contém genes que codificam proteínas, entre elas a proteína de ligação ATP transportadora da enterobactina férrica. É sabido que a *E. coli* O157:H7 pode sintetizar e transportar enterobactinas, e possui um sistema de transporte de citrato férrico, mas o papel desempenhado pelo gene *fepC* na virulência precisa ser esclarecido (YE e XU, 2001).

### ***iucD* – Aerobactina**

É um sideróforo (aerobactina) presente em um plasmídeo de virulência da *E. coli* que atua como um limpador de ferro. Sob condições de estresse férrico, a maioria das bactérias induzem uma alta afinidade pelo sistema de transporte de ferro mediado por quelantes chamados de sideróforos. Análises sugeriram pelo menos dois domínios de adesão da proteína *iucD* à membrana citoplasmática interna (HERRERO et al., 1988).

### ***Tsh* – temperature-sensitive hemagglutinin (hemaglutinina sensível a temperatura)**

O gene *tsh* é um membro do grupo das proteínas autotransportadoras e foi identificado pela primeira vez em *E. coli* patogênica para aves (APEC). Algumas sequências de DNA do *tsh* também foram verificadas em plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade de vários patotipos de *E. coli* e outros membros patogênicos da Enterobacteriaceae (DOZOIS et al., 2000).

### **Cnf1 – cytotoxic necrotizing factors (fatores citotóxicos necrosantes)**

O *cnf1* é produzido por diferentes cepas de *E. coli* isoladas de infecções extraintestinais e também de diarreia. *Cnfs* causam formação de células multinucleadas e induzem uma deformação na membrana. Essa toxina causa danos ao tecido e morte do animal hospedeiro (SCHMIDT et al., 1997).

### **Adesinas fimbriais de EHEC**

A análise da sequência genômica de duas cepas protótipos do sorotipo O157:H7 indicou a existência de, no mínimo, 12 regiões que codificam sequências homólogas a adesinas. Uma dessas regiões contém genes proximamente relacionados ao operon *lpf* (fimbria longa polar, LP) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (PERNA et al., 2001).

A introdução do operon EHEC *lpf* em *E. coli* K-12 resultou em um aumento da expressão de fímbrias e da adesão a células em cultivo. A subunidade principal de LP, *lpfA*, foi detectada em cepas de EHEC dos sorogrupos O157 e O145 (SZALO et al., 2002).

Adesinas como *pap* (pili associado à pielonefrite) medeiam a ligação específica de *E. coli* patogênica para as células epiteliais do trato urinário (DAIGLE et al., 1994).

### **Adesinas afimbriais de EHEC**

Neste grupo estão as adesinas *efa1* (EHEC *factor for adherence*) (NICHOLLS et al., 2000; STEVENS et al., 2002), Iha (adesina homóloga a IrgA, de *Vibrio cholerae*), Cah (homólogo ao antígeno 43 ligante de cálcio) e OmpA (proteína de membrana externa A) (TORRES e KAPER, 2003).

Estas proteínas expressaram suas propriedades de adesão somente em experimentos recombinantes, e seu papel na colonização do trato gastrointestinal requer maiores estudos.



### 3.2.3. Resistência a antimicrobianos

Apesar de algumas pesquisas mostrarem que a *Escherichia coli* O157:H7 pode ser sensível a vários antimicrobianos (SCHROEDER et al., 2002; KAPPELI et al., 2011), outros estudos revelam um aumento na resistência deste sorotipo ao longo do tempo (DOYLE et al., 1997; MORA et al., 2005; BUVENS et al., 2012; SASAKI et al., 2012).

Sasaki et al. (2012) verificaram que cepas de STEC O157:H7 e O26 isoladas de gado de corte no Japão tiveram uma resistência de, respectivamente, 5,4% e 36,4% à ampicilina. Os autores ressaltaram ainda multirresistência aos antimicrobianos em 13,3% dos isolados de O157 e 54,5% dos de O26.

Schroeder et al. (2002), buscando entender melhor a prevalência da resistência a antimicrobianos em isolados de *E. coli* O157 provenientes de humanos, bovinos, suínos e alimentos, entre os anos de 1985 a 2000, observaram a *E. coli* O157:H7 em 52% dos isolados, sendo 10% deles resistentes a sulfametazol e 8% a tetraciclina.

A resistência a antimicrobianos também foi relatada em isolados de STEC O157:H7 e não-O157 provenientes de humanos, bovinos, ovinos e alimentos na Espanha, sendo que 98% das STEC O157:H7 e 92% das STEC não-O157 apresentaram multirresistência a cinco ou mais antimicrobianos (MORA et al., 2005).

Outro estudo comparando diferentes métodos de detecção de *E. coli* O157:H7 isoladas de animais durante o processo de abate mostrou que, do total de 11 culturas, cinco (45%) eram resistentes a dois ou mais dos 23 agentes antimicrobianos testados, sendo 100% dos isolados resistentes à eritromicina (15 µg), 27,2% à ampicilina (10 µg), 18,2% à cefalotina (30 µg) e à tetraciclina (30 µg) (KIM et al., 2005). Vaz et al. (2004) também verificaram a resistência de STEC isoladas de humanos no Brasil resistentes a pelo menos um antimicrobiano.

No Brasil, Rodolpho e Marin (2007) analisaram amostras obtidas de 23 açougues e isolaram *E. coli*, entre elas STEC, de amostras de carne, mãos de manipuladores e equipamentos. Os autores verificaram que 67% das culturas apresentaram resistência a pelo menos três antibióticos e que 22% delas eram



resistentes a seis deles. Ainda, dentre as quatro STEC isoladas, três apresentaram resistência, uma à amoxicilina (10 µg), uma ao ácido naxílico (30 µg), à cefalotina (30 µg), à amoxicilina (30 µg) e à tetraciclina (30 µg) concomitantemente e outra à ciprofloxacina (5 µg), à amicacina (30 µg), à ampicilina (10 µg), ao ácido naxílico (30 µg), à cefalotina (30 µg), à amoxicilina (30 µg) e à tetraciclina (30 µg), simultaneamente.

Uma pesquisa realizada com amostras de conteúdo intestinal de bovinos demonstrou que esses animais são potenciais fontes de contaminação, devido a presença de *E. coli* atípicas resistentes à antimicrobianos, que possuem genes de virulência. A resistência a antimicrobianos foi verificada em nove dos 21 sorotipos de *E. coli* sorbitol-negativa e a multirresistência a cinco antimicrobianos foi relatada em cinco isolados (DIARRA et al., 2009).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da indústria e das amostras estudadas

A indústria onde o trabalho foi desenvolvido localiza-se no interior do Estado de São Paulo, sendo caracterizada, por suas dependências e instalações, como um matadouro-frigorífico (BRASIL, 1997). Desta forma, ela é submetida a um controle higiênico-sanitário permanente, pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), possuindo instalações para abate, preparo e conservação da carne bovina. O volume de abate é de aproximadamente 800 animais por dia e seus produtos são comercializados tanto nacional como internacionalmente.

Foram colhidas amostras de pontos do fluxograma ou dos produtos de abate bovino que poderiam atuar como veículo de transmissão de *E. coli* O157:H7 à carne ou pontos de disseminação do microrganismo na indústria, particularmente no processo de abate, conforme descrito a seguir.

- Água de abastecimento – coleta da água clorada, utilizada em todas as atividades da indústria, envolvendo o banho dos animais antes do abate (banheiro de aspersão) e após a insensibilização, a lavagem das carcaças após a toaleta, a constituição de produtos comestíveis e a higienização de dependências e equipamentos, entre outras coisas.
- Conteúdo intestinal – coleta do conteúdo da junção reto-anal do animal, na área de vômito após a insensibilização do animal no boxe de atordoamento.
- Superfície da pele do animal após a lavagem por aspersão - Amostras representativas desse ponto de colheita foram obtidas da região dorso-caudal do animal, após a fase de sangria durante o tempo regulamentar (BRASIL, 1997).
- Superfície muscular externa de carcaças – após a evisceração e na fase de toaleta das carcaças, a colheita das amostras foi realizada em quatro pontos da superfície das mesmas, fazendo parte destes pontos o flanco, o pescoço, o peito alto e a alcatra (BRASIL, 1988), segundo a Decisão 471/2001 da Comunidade Europeia (COMUNIDADE EUROPEIA, 2001).

- Superfície muscular interna de carcaças – após a evisceração e na fase de toailete das carcaças, amostras da superfície muscular interna das carcaças foram obtidas nos mesmos pontos anteriormente citados, porém do lado interno da carcaça.
- Água residuária da lavagem de carcaças – coleta da água que escorre ao longo das faces interna e externa das meias carcaças, após sua lavagem na parte final do fluxograma de abate.
- Carne pronta para comercialização – essas amostras foram compostas por fragmentos de carne colhidos anteriormente à desossa e preparação dos cortes de açougue.
- Superfície das mãos dos manipuladores – essas amostras foram colhidas durante os trabalhos, das palmas, dorso e espaço interdigitais das mãos de indivíduos que fazem a esfolia das carcaças.
- Superfície de facas utilizadas na sala de matança – essas amostras foram obtidas da lâmina, do cabo e junção da lâmina e cabo das facas utilizadas na esfolia das carcaças.

#### **4.2. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras**

As amostras foram colhidas ao acaso em 14 dias normais de trabalho, durante o período de janeiro/2011 a abril/2011, sendo coletados de 50 animais os seis pontos anteriormente citados, somando 300 amostras dos animais, sete amostras da água de abastecimento da indústria, 21 da superfície de mãos dos manipuladores e 21 da superfície de facas, totalizando 349 amostras.

As amostras da água de abastecimento foram colhidas em quantidade aproximada de 400 mL em um ponto da sala de matança, com os devidos cuidados de assepsia, em sacos de polietileno estéreis contendo pastilhas de tiosulfato de sódio a 10% (Whirl-pak, Nasco), com a finalidade de neutralizar a ação do cloro, na quantidade de 0,1 mL de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra. No momento da colheita foi determinado o teor de cloro residual livre por funcionário do matadouro-frigorífico, aproveitando o resultado obtido, já que esta prática é feita de forma constante por determinação do Serviço de Inspeção Federal.

As amostras de conteúdo intestinal foram colhidas no box de atordoamento, após a insensibilização dos animais, especificamente daqueles animais em que era possível este tipo de colheita. Essas amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno estéreis (Whirl-pak, Nasco). A porção terminal do reto foi escolhida como ponto de colheita das amostras por ser o principal local de existência da *E. coli* O157 no bovino e também pelo fato de a mucosa da porção terminal do reto ser associada a alta taxa de excreção da bactéria nas fezes (LOW et al., 2005).

As amostras representativas da superfície da pele do animal após a lavagem por aspersão, da superfície muscular externa e interna da carcaça, foram colhidas com suabes de esponja esterilizados colocados assepticamente em sacos de polietileno estéreis (Whirl-pak, Nasco) contendo 10 mL de água peptonada a 0,1% estéril.

Cada suabe foi utilizado para a colheita de material da pele de um animal ou de uma carcaça, no caso da pele molhada e superfície muscular. Nesses casos foi delimitada uma área de colheita de 100 cm<sup>2</sup>, utilizando-se para a demarcação um gabarito em aço inoxidável (APHA, 2001). O suabe foi friccionado sobre a área demarcada pelo gabarito dez vezes na vertical, dez vezes na horizontal e dez vezes na diagonal por aproximadamente 20 segundos em cada direção (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2001). Antes da colheita, o suabe foi pressionado, visando a retirada do excesso de água peptonada.

As amostras da água residuária da lavagem das meias carcaças foram colhidas em sacos de polietileno estéreis (Whirl-pak, Nasco) após a lavagem das mesmas, durante a etapa em que o excesso dessa água escorre ao longo das faces externa e interna das meias carcaças, sendo cada amostra correspondente a duas meias carcaças.

As amostras de carne foram colhidas após a carcaça passar 24 horas na câmara fria e antes da entrada na sala de desossa, sendo compostas por fragmentos coletados de diversos pontos das meias carcaças. Os fragmentos foram acondicionados em sacos de polietileno estéreis (Whirl-pak, Nasco).

Para a colheita de material das facas e das mãos, foi utilizado um suabe de esponja esterilizado, embebido em 10 mL de água peptonada a 0,1% estéril, para cada amostra, sendo colhido de toda a superfície da lâmina da faca e da junção da lâmina

com o cabo, e espaços interdigitais e palma das mãos. Após a colheita, todos os suabes foram novamente mergulhados na água peptonada a 0,1% para o transporte.

Os animais escolhidos, ou seja, aqueles em que era possível a colheita de fezes, foram etiquetados numericamente no traseiro e no dianteiro e na ponta de agulha, e acompanhados nas diversas etapas do abate para que as amostras de superfície de pele úmida, de superfície muscular externa e interna da carcaça, de água residuária da lavagem da carcaça e de fezes fossem obtidas sempre do mesmo animal. Também foram coletados os dados dos respectivos animais, como o local de origem, para ajudar no estudo epidemiológico (Apêndice 1).

O transporte das amostras foi realizado em caixas de material isotérmico contendo gelo reciclável. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, Brasil.

### **4.3. Metodologia empregada no isolamento de *Escherichia coli* O157:H7**

#### **4.3.1. Preparo das amostras e enriquecimento seletivo (APHA, 2001)**

As amostras da água de abastecimento, após homogeneização manual, foram filtradas em membranas de éster de celulose<sup>1</sup> de 47 milímetros de diâmetro e poros de 0,45 micrômetros. Essas membranas foram picadas em pedaços pequenos e os fragmentos colocados em Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de caldo de enriquecimento TSBm (Modified tryptone soya broth, Oxoid, England) adicionado de novobiocina (20 mg/L – Novobiocin selective supplement, Oxoid, England). A incubação do conjunto foi realizada em estufa bacteriológica a 37°C, sendo numa primeira fase sob agitação por 6 horas e, em seguida, por 18 horas em repouso.

O enriquecimento seletivo das amostras da água residuária da lavagem das meias carcaças foi realizado homogeneizando-se 10 mL dessa água com 100 mL de caldo TSBm adicionado de novobiocina (20 mg/L).

---

<sup>1</sup> Swinnex Disc Filter - Millipore

O enriquecimento seletivo das amostras de carne e de conteúdo intestinal também foi realizado em caldo TSBm adicionado de novobiocina (20 mg/L), após a homogeneização em aparelho Stomacher<sup>2</sup>, de 25 gramas da amostra com 225 mL do referido caldo, a 37°C sob agitação por seis horas e reincubadas em repouso por mais 18 horas.

Nos sacos de polietileno estéreis (Whirl-pak, Nasco) com suabes embebidos em água peptonada a 0,1% foram vertidos 100 mL de caldo TSBm adicionado de novobiocina (20 mg/L ) e incubados da mesma forma que os anteriores.

#### **4.3.2. Plaqueamento seletivo, isolamento das colônias e identificação presuntiva de *E. coli* O157:H7 (APHA, 2001)**

A partir das culturas de enriquecimento seletivo foram semeadas, para cada amostra, duas placas contendo ágar MacConkey Sorbitol (Oxoid, England) adicionado de 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio (CT-SMAC, Invitrogen, USA), sendo uma placa referente ao enriquecimento durante seis horas e a outra referente à incubação por 24 horas. Com auxílio de alça de níquel-cromo, uma alíquota do caldo de enriquecimento foi espalhada sob a forma de estrias na superfície do meio de cultura. A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas até cinco colônias com características sugestivas de *E. coli* O157:H7, ou seja, colônias transparentes ou acinzentadas, por não fermentarem o sorbitol, as quais foram estocadas em tubos contendo ágar tripticase soja (TSA).

As colônias com as características descritas foram submetidas à coloração pelo método de Gram, para verificação da morfologia. Uma vez constatada a presença de bacilos Gram-negativos, em cultura pura, as culturas foram submetidas a provas bioquímicas como o teste de produção de indol, inoculação em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) para verificar a utilização da glicose e lactose sem formação de H<sub>2</sub>S, provas do Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP), aproveitamento de

---

<sup>2</sup> Stomacher, Marca Marconi, Modelo MA440

citrato (C), da motilidade, fermentação do sorbitol, e descarboxilação da lisina e ornitina.

As amostras presuntivas de *E. coli* O157 através das provas bioquímicas foram enviadas em tubos contendo ágar TSA inclinado para a Universidade de Montreal, Saint-Hyacinthe-QC, Canadá. A sorotipagem e também a caracterização dos isolados por meio de técnicas moleculares foram realizadas no laboratório referência da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) para *Escherichia coli* (ECL) do Departamento de Patologia e Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária daquela Universidade.

As amostras presuntivas foram armazenadas sob refrigeração em tubos contendo ágar TSA inclinado para utilização imediata e também foram estocadas a uma temperatura de - 80°C, em caldo Luria – Bertani (LB) adicionado de 30% de glicerol (BEKAL et al., 2003; HAHM et al., 2003).

#### **4.4. Caracterização molecular dos isolados**

A caracterização molecular dos isolados foi realizada por meio da PCR para detectar o sorotipo O157:H7 pela amplificação das sequências dos genes *rfb*<sub>O157</sub> e *fliC*<sub>H7</sub> (Figura 1 e 2). A PCR também foi utilizada para verificar a presença dos genes das toxinas *stx1* (*stxA*), *stx2* (*stx2A*), *eae* (*eaeA* - intimina) (Figura 3) e variantes de *stx2* (*vtx2a*, *vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f* e *vtx2g*).

Como recentemente o grupo das STEC não-O157 surgiu como patógeno emergente associado a doenças humanas severas, bem como houve um aumento em sua prevalência nos animais, principalmente em bovinos, e nos alimentos em relação às STEC O157 (BEUTIN et al., 1998; JORIS et al., 2011; MONAGHAN et al., 2011) é que decidiu-se submeter os isolados negativos para *E. coli* O157:H7, porém positivos para algum dos genes de virulência (*stx1*, *stx2* ou *eae*) testados à PCR, para sorotipagem de oito não – O157: O26, O55, O91, O103, O111, O113, O121 e O145, mesmo estes sorogrupos sendo conhecidos por fermentarem o sorbitol.

Os isolados que não se apresentaram como *E. coli* O157:H7 e não – O157 na PCR foram submetidos à sorologia. A tipagem por soroaglutinação foi realizada utilizando, para cada isolado, solução salina adicionada de cultura proveniente do

TSA, submetida a 100°C por uma hora e soro de coelho para sorogrupos O de *E. coli* (CAMGUILHEM e MILON, 1989; ORSKOV e ORSKOV, 1984).

Após a identificação dos sorotipos, no mínimo um isolado para cada tipo de amostra foi escolhida para a caracterização por meio da PCR, dos genes de virulência responsáveis por aumentar a severidade da doença nos humanos como EHEC *hlyA* (hemolisina), *paa*, *efa1*, *Sta* (*setA*), *Stb* (*estB*), *LT* (*eltB*), *tsh*, *uicD* (aerobactin), *papC*, *cnf1* (cytotoxic necrotizing factor), *lpfA*<sub>O141</sub>, *lpfA*<sub>O26</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub> e *fepC*. Para isso, foram utilizados primers específicos (Tabela 1).

#### 4.4.1. Extração do DNA bacteriano

A partir das culturas prontas para o uso em tubos com ágar TSA inclinado ou a partir das culturas em caldo LB descongeladas, foram retiradas alíquotas com auxílio de uma alça de níquel-cromo e semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue (Oxoid) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após, foram selecionadas colônias as quais foram suspensas em caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37°C por 16 horas para serem submetidas à extração do DNA pelo método de fervura, de acordo com a metodologia utilizada pelo laboratório referência da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) para *Escherichia coli*.

Para extrair o DNA, 1,0 mL do caldo LB de cada amostra foi centrifugado a 13.400 g por dois minutos, o sobrenadante descartado e em seguida foi misturado ao precipitado do tubo 1,0 mL de tampão FA (Difco) e centrifugado. Após, o sobrenadante foi descartado, o precipitado suspenso em 0,5 mL de água Milli-Q, submetido à fervura a 100°C por 10 minutos e após centrifugado novamente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, conservando o DNA à temperatura de -20°C.

#### 4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR)

A PCR foi realizada utilizando os termocicladores PTC-0200 DNA Engine® (Biorad Laboratories, Canada) e T Personal® (Biometra, Alemanha). A amplificação



dos genes, utilizando os primers e as temperaturas de anelamento descritos na Tabela 1, foi realizada com volume total de reação de 25 microlitros, contendo 5  $\mu\text{L}$  de DNA bacteriano e 20  $\mu\text{L}$  da mistura composta 200 mM de cada dNTP, 5 ou 10 pmol de cada primer, 10X de tampão sintético da polimerase contendo 2,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , água mili-Q livre de DNA e RNA e 2U (concentração final de 5U/ $\mu\text{L}$ ) de HotStar Taq DNA polimerase (Quiagen®, Alemanha).

Após a eletroforese, durante 40 minutos a 96 V, os produtos amplificados da PCR foram visualizados em gel padrão de eletroforese contendo 1,8% (wt/vol) de gel de agarose corado com 3  $\mu\text{L}$  de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). O gel foi fotografado sob luz UV pelo sistema de documentação Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os marcadores de peso moleculares (100 bp DNA ladder, Invitrogen, USA) foram adicionados a cada gel de agarose.

#### **4.4.3. Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE)**

O perfil genético dos isolados de *E. coli* foi determinado por eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) após a macrorrestrição do DNA pela endonuclease *Xba* I, utilizando o aparelho CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) seguindo o protocolo utilizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças para *Escherichia coli* (O157:H7 e não-O157), *Salmonella*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* (PULSENET, 2009).

#### **4.4.4. Detecção dos fragmentos amplificados**

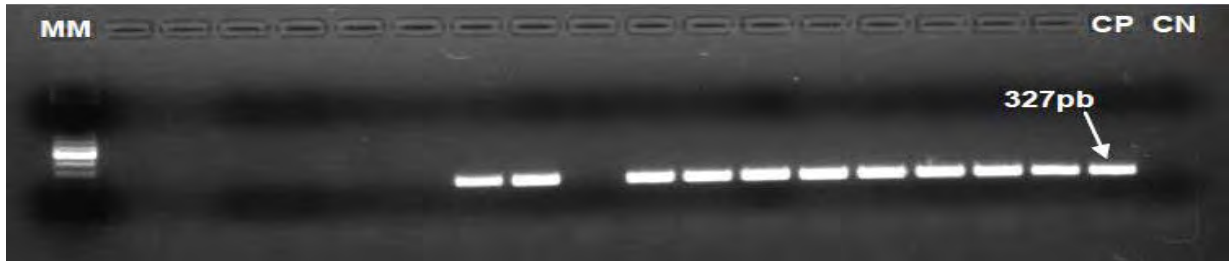
Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{l}/\text{mL}$ ) durante 30 minutos e os produtos oriundos da amplificação visualizados sob luz ultravioleta (UV) e documentados em um fotodocumentador modelo Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**Tabela 1. Características dos primers utilizados na PCR.**

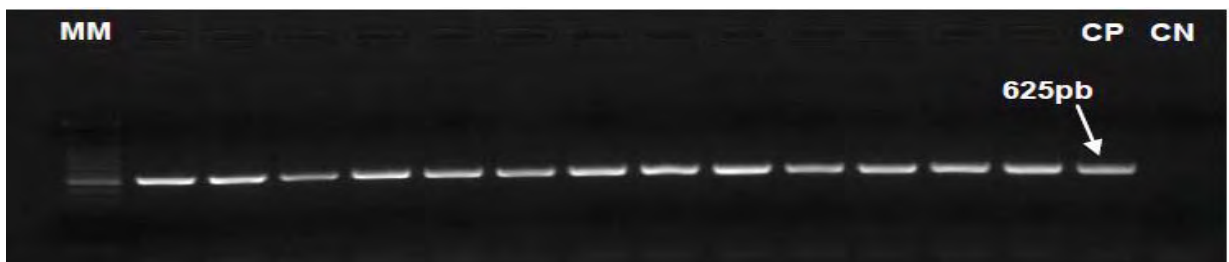
Gene	Seqüência (5' → 3')	PCR			Referência
		amplicon (pb)	Condições da PCR	Concentração do primer (pmol)	
<i>rfbE<sub>O157</sub></i>	F: CTACAGGTGAAGGTGGAATGG R: ATTCCTCTCTTCCCTTGCGG	327	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	WANG et al., 2002
<i>flhC<sub>H7</sub></i>	F: GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC R: AACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	GANNON et al., 1997
<i>stxA</i>	F: TTAGACTTCTCGACTGCAAAG R: TGTGTACGAAATCCCCTCTG	531	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	WOODWARD et al., 1992
<i>stx2A</i>	F: TTATATCTGCGCGGGTCTG R: AGACGAAGATGGTCAAAACG	327	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	WOODWARD et al., 1992
<i>eaeA</i>	F: CATTATGGAACGGCAGAGGT R: ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA	791	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	BEAUDRY et al., 1996
<i>vtx2a</i>	F: GCGTACTGRBACTGTGGCC R2: CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG R: GGCCACCTTCACTGTGAATGTG	349	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá
<i>vtx2b</i>	F: AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC R: CAGCAAAATCCTGAACCTGACG	251	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá
<i>vtx2c</i>	F: GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA R: CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá
<i>vtx2d</i>	F: AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG R: TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	280	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá
<i>vtx2e</i>	R2: GCCTGATGCACAGTACTGGAC F: CGGAGTATCGGGGAGAGGC R: CTTCTGACACCTTACACGTAAGGT	411	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá
<i>vtx2f</i>	F: TGGGCGTCACTCACTGGTTG R: TAATGGCCGCCCTGTCTCC	424	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá
<i>vtx2g</i>	F: CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC R: GATGGCAATTCAGAAATAACCCGCT	573	95°C, 15min; 35 ciclos de 94°C por 50s, 62°C por 40s, 72°C por 60s; extensão final de 72°C, 3min	05	Lab. de referência para <i>E. coli</i> - Canadá

wzx-wzy	F: AAATTAGAAGCGGTTTCATC R: CCCAGCAAGCCAAATTATGACT	596	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	DURSO et al., 2005
O26					
wbgN	F: TGTAATTCGATGCACCAATTCAG R: CGCTTCGACGTTCCGATACATAA	70	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	PERELLE et al., 2004
O55					
wzy O91	F: CGATTTTCTGGAATGCTTGATG R: CAATACATAGTTTGATTTGTTTAAAAGTTTAAAT	105	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	PERELLE et al., 2004
wzx	F: TTGGAGCGTTAACTGGACCT R: GCTCCCGAGCACGTAATAAG	321-280	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	FRATAMICO et al., 2005
O103					
O111	F: TAGAGAAATATCAAGTTAGTTCC R: ATAGTTATGAACATCTTTGTTAGC	406	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	PATON & PATON, 1998a
O113	F: AGCGTTTCTGACATATGGAGTG R: GTGTTAGTATCAAAAAGAGGCTCC	593	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	PATON et al., 1999
wzx	F: GTAGCGAAAAGTTAGACTGG R: ATGGGAAAGCTGTACTGC	651	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	MONDAY et al., 2007
O121					
wzx1	F: ACTGGGATTTGGACGTGGATA R: AGGCAAGCTTTGGAAATGAA	222	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	FRATAMICO et al., 2009
O145					
e1fB – LT	F: TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA R: GGTCGCGTCAGATATGTGATTC	275	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	FURRER et al., 1990
estA –	F: TCCCCCTCTTTAGTCAGTCAACTG R: GCACAGGCAGGATTACAACAAAAGT	163	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	5	NGELEKA et al., 2003
Sta					
estB –	F: GCAATAAGGTTGAGGTGAT R: GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	368	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	LORTIE et al., 1991
STb					
papC	F: GACGGCTGACTGCAGGGTGTGGCG R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	DAIGLE et al., 1994
Cnf	F: TCGTTATAAAAATCAAAACAGTG R: CTTTACAATATTGACATGCTG	446	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	EWERS et al., 2007
iucD	F: AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA R: CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	778	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	HERRERO et al., 1988

<i>Tsh</i>	F: GGTGGTGCACCTGGAGTGG R: AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	DOZOIS et al., 2000
<i>EHEC</i>	F: ACGATGTGGTTTATTCTGGA R: CTTACCGTGACCATACATAT	165	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	FAGAN et al., 1999
<i>hlyA</i>	F: GAGACTGCCAGAGAAAAG R: GGTATTGTTGCATGTTCCAG	479	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	NICHOLLS et al., 2000
<i>efa1</i>	F: ATGAGGAACATAAATGGCAGG R: TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	360	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	AN et al., 1999
<i>Paa</i>	F: CCGCTTGTGTTGTCTCC R: AGCAGATTTACCAGTATTCA	295	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	BIELASZEWSKA et al., 2005
<i>lpfA<sub>0113</sub></i>	F: ATGAAGCGTTAATATTATAG R: TTATTTCTTATATTCGAC	573	94°C, 5min; 30 ciclos de 94°C, 1min; 50°C, 1min; 72°C, 2min; extensão final de 72°C, 5min	10	OSEK et al., 2003
<i>lpfA<sub>0141</sub></i>	F: CTGCGCATTGCCGTAAC R: ATTTACAGGCGAGATCGTG	412	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	TOMA et al., 2004
<i>fepC</i>	F: TACCTGGATAATGCTGTCGG R: ATGGTGTGATGGGGCTGGC	347	94°C, 5min; 24 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s; extensão final de 72°C, 5min	10	YE e XU, 2001



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR dos primers O157. Controle positivo (CP) EDL 933, controle negativo (CN) água e marcador molecular (MM) de 100 pb (Invitrogen®).



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR dos primers H7. Controle positivo (CP) EDL 933, controle negativo (CN) água e marcador molecular (MM) de 100 pb (Invitrogen®).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR multiplex dos primers *eae*, *stx1* e *stx2*. Controle positivo (CP) EDL 933, controle negativo (CN) água e marcador molecular (MM) de 100 pb (Invitrogen®).

#### 4.5. Testes de susceptibilidade dos isolados frente à ação de antimicrobianos

Para a realização desses testes, as culturas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de caldo tripticase soja e incubadas a 37°C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica em tubos contendo 4 mL de solução salina esterilizada, até a obtenção de turvação idêntica à da solução padrão de cloreto de bário, preparada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário a 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v/v). A seguir, as culturas diluídas foram semeadas, com auxílio de suabes esterilizados, em placas com ágar Muller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário à secagem da superfície do meio, foram colocados os polidiscos contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37°C, através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada (BAUER et al., 1966). Os diâmetros obtidos em milímetro foram comparados com os padrões estabelecidos pelo Instituto de Padrões Clínico e Laboratorial (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) presentes na tabela fornecida pelo fabricante dos discos.

Foram utilizados, para cada uma das cepas testadas, polidiscos (Polisensidisc 15 DME® série Gram-negativo) contendo os seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), ampicilina (10 µg), aztreonam (30 µg), cefalotina (30 µg), cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftadizima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina/tazobactam (110 µg), sulfazotrim (25 µg), tetraciclina (30 µg).

#### 4.6. Análise Estatística

O período de incubação das amostras e a presença de *stx*<sub>2</sub> com *fepC* foram analisados pelo teste do teste do qui-quadrado e a correção realizada pelo teste de Fisher (SAS, 2005), sendo  $p < 0,05$  considerado como estatisticamente significante.

A análise dos dados da PFGE foi realizada com o auxílio do programa Bionumerics versão 6.5 (Maths, Kortrijk, Bélgica), o qual determinou o grau de similaridade dos isolados utilizando o coeficiente de Dice e gerou dendrogramas pela análise de pares de grupos utilizando a média aritmética (UPGMA –

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic), com configurações de otimização e tolerância de 1,0%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Número de colônias, prevalência e perfil de virulência das amostras

Os resultados relativos à distribuição das colônias sugestivas de *E. coli* O157:H7 isoladas no ágar MacConkey Sorbitol (fase presuntiva), a partir das amostras colhidas nos diferentes produtos ou locais estudados, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Distribuição de colônias presuntivas de *E. coli* O157:H7, detectadas por testes bioquímicos, em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Número de amostras	Tipo de amostra	Número de colônias		
		Típicas	Atípicas	Total
50	Fezes	83	11	94 (33,69%)
50	Pele	41	29	70 (25,09%)
50	Músculo interno de carcaças	7	19	26 (9,32%)
50	Músculo externo de carcaças	6	18	24 (8,60%)
50	Carne	9	8	17 (6,09%)
50	Água residuária da lavagem de carcaças	6	2	8 (2,87%)
21	Mãos	13	9	22 (7,88%)
21	Facas	7	11	18 (6,45%)
7	Água da indústria	0	0	0 (0,00%)
349		172 (61,65%)	107 (38,35%)	279 (100%)

Observa-se na Tabela 2 que nas 349 amostras colhidas nos diferentes pontos estudados, 279 apresentaram colônias presuntivas de *E. coli* O157:H7 por meio dos testes bioquímicos, sendo a água de abastecimento da indústria, que apresentava teor de cloro variando de 0,5 a 0,8 ppm, o único tipo de amostras negativas para a presença de colônias sugestivas, confirmando a eficiência do cloro no tratamento da água.

Manna et al. (2010), em um estudo sobre *E. coli* sorbitol – negativas isoladas de 556 amostras de alimentos e fezes de bovinos, encontraram 175 colônias sugestivas de *E. coli* O157 no CT-SMAC.

Entre as 279 colônias sorbitol negativas, foram encontradas 107 (38,35%) que em um ou dois testes bioquímicos apresentaram resultados não condizentes com o



perfil do sorotipo O157:H7, sendo essas denominadas colônias atípicas e 172 (61,65%) colônias típicas, ou seja, que apresentaram resultados esperados. Friedrich et al. (2002) encontraram porcentagem semelhante (51,9%) em isolados de *E. coli* O157:H7 ou O157:H<sup>-</sup> sorbitol negativos provenientes de pacientes com SHU.

A maior proporção de colônias sugestivas de *E. coli* O157:H7 foi observada nas fezes dos animais (33,69%), seguido de suabe de pele (25,09%), suabe do músculo interno da carcaça (9,32%), suabe do músculo externo da carcaça (8,60%), suabe de mãos dos funcionários (7,88%) e de facas (6,45%), carne (6,09%) e água residuária da lavagem de carcaças (2,87%).

Os resultados relativos à presença de genes de virulência nas colônias presuntivas de *E. coli* O157:H7, a partir das amostras coletadas nos diferentes produtos ou locais estudados, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição das colônias presuntivas de *E. coli* O157:H7, isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, segundo os genes de virulência detectados por PCR, estado de São Paulo, 2011.

Genes de virulência	Número de colônias presuntivas de	
	<i>E. coli</i> O157:H7	Porcentagem de colônias presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7
<i>eae</i> e <i>stx2</i>	44	48,89%
<i>eae</i>	29	32,22%
<i>stx1</i>	11	12,22%
<i>stx2</i>	3	3,33%
<i>stx1</i> e <i>stx2</i>	2	2,22%
<i>eae</i> , <i>stx1</i> e <i>stx2</i>	1	1,12%
Total	90	100,0%

Verifica-se na Tabela 3 que em 90 (32,26%), das 279 colônias presuntivas para *E. coli* O157:H7, foram identificados os genes *eae*, *stx1* ou *stx2*, sendo os genes *eae* e o *stx2*, concomitantemente, identificados em 44 (48,89%) delas, o *eae* em 29 (32,22%), o *stx1* em 11 (12,22%), o *stx2* em 3 (3,33%), o *stx1* e o *stx2* em 2 (2,22%) e o *stx1*, *stx2* e *eae* em 1 (1,12%).

A Tabela 4 mostra o número de isolados de *E. coli* O157:H7, segundo o tipo de amostra em que foram encontrados, e a distribuição dos genes de virulência identificados.

**Tabela 4.** Número de isolados de *E. coli* O157:H7, segundo o tipo de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino em que foram encontrados e os genes de virulência identificados, estado de São Paulo, 2011.

Tipo de amostra	Genes de virulência	Nº de isolados de <i>E. coli</i> O157:H7 (%)
Fezes	<i>eae</i> e <i>stx2</i>	38 (71,70%)
Fezes	<i>eae</i>	7 (13,21%)
Pele	<i>eae</i> e <i>stx2</i>	5 (9,43%)
Pele	<i>eae</i>	2 (3,77%)
Pele	<i>stx2</i>	1 (1,89%)
Total		53 (100,0%)

A confirmação da *E. coli* O157:H7 pela PCR foi obtida em 53 (19,00%) das 279 colônias, sendo 45 (84,91%) delas provenientes das fezes dos animais e 8 (15,19%) de suabe de pele. Entre os 53 isolados, 43 (81,13%) apresentaram os genes *eae* e *stx2* concomitantemente, 9 (16,98%) o *eae* e 1 (1,89%) o *stx2*, sendo todos negativos para o *stx1* (Tabela 4).

Em relação ao local de isolamento da *E. coli* O157:H7 e os genes de virulência identificados, 38 (71,70%) dos 53 isolados apresentaram os genes *eae* e *stx2*, concomitantemente, e 7 (13,21%) deles que apresentaram somente o gene *eae* foram encontrados nas fezes. Os demais isolados, sendo 5 (9,43%) com genes *eae* e *stx2*, concomitantemente, 2 (3,77%) com o gene *eae* e 1 (1,89%) com o gene *stx2*, foram encontrados em amostras de pele (Tabela 4).

As culturas negativas para a *E. coli* O157:H7 foram submetidas à PCR para as não-O157 e as culturas não sorotipadas pela PCR, foram caracterizadas sorologicamente (Tabelas 5 e 6).

A distribuição dos isolados de *Escherichia coli* de acordo com o patotipo, sorotipo, tipo de amostra, tempo de incubação na fase de enriquecimento seletivo, número de isolados e genes de virulência apresenta-se na Tabela 5.

A Tabela 6 mostra os sorotipos de *E. coli* não-O157 isolados de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, tipo de amostra, sua identificação e genes respectivos de virulência.

**Tabela 5.** Identificação das *Escherichia coli* isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, em relação a patótipo, sorótipo, tipo de amostra, tempo de incubação na fase de enriquecimento seletivo e genes de virulência, estado de São Paulo, 2011.

Patótipo	Sorótipo	Tipo de amostra	Origem do animal	Identificação da amostra	Nº de isolados de acordo com o tempo de incubação no ágar CT-SMAC (%)			Número de isolados (%)			
					6 horas	24 horas	eee	stx1	stx2		
STEC	O157:H7	Fezes	3	3	1	0	1	0	1		
	O157:H7	Fezes	8	18	13	0	13	0	13		
	O157:H7	Fezes	12	29	3	2	5	0	5		
	O157:H7	Pele	12	29	1	0	1	0	1		
	O157:H7	Fezes	12	30	1	0	1	0	1		
	O157:H7	Pele	12	31	4	0	3	0	4		
	O157:H7	Fezes	16	45	15	3	18	0	18		
	O157:H7	Pele	16	45	1	0	1	0	1		
	O26	Faca	-	9	1	0	0	1	0		
	O116	Pele	1	1	1	0	0	1	0		
	O116/NT	Fezes	1	1	2	0	0	2	0		
	O147	Fezes	8	11	1	0	0	1	1		
	O141	Fezes	8	18	1	0	1	1	1		
	O82/NT	Fezes	11	26	2	0	0	2	0		
	O4/O23	Fezes	12	29	1	0	0	1	0		
	O113	Pele	12	30	1	0	0	1	1		
	O53	Pele	12	32	1	0	1	1	1		
	O75	Pele	10	20	1	0	0	0	1		
	O7	Músculo interno de carcaças	9	12	1	0	0	1	0		
	NT	Músculo externo de carcaças	1	1	1	0	0	1	0		
	NT	Pele	6	6	1	0	0	0	1		
	NT	Pele	14	38	1	0	0	1	0		
	NT	Pele	10	22	1	0	0	1	0		
EPEC	O157:H7	Fezes	12	29	2	3	5	0	0		
	O157:H7	Fezes	12	30	2	0	2	0	0		
	O157:H7	Pele	12	31	2	0	2	0	0		
	O26	Pele	8	13	1	0	1	0	0		
	O26	Músculo externo de carcaças	8	14	1	0	1	0	0		
	O26	Pele	8	14	4	0	4	0	0		
	O26	Água residuária da lavagem de carcaças	8	15	6	0	6	0	0		
	O26	Pele	8	18	3	0	3	0	0		
	O26	Faca	-	14	1	0	1	0	0		
	O22	Fezes	12	29	1	0	1	0	0		
	O22	Pele	12	29	1	0	1	0	0		
	O71	Pele	12	29	1	0	1	0	0		
	O73	Pele	16	45	1	0	1	0	0		
	Total					82 (29,39%)	90 (32,26%)	8 (2,87%)	74 (82,22%)	14 (15,55%)	50 (55,55%)

**Tabela 6.** Sorotipos de *E. coli* não-O157 isolados de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, tipo de amostra, sua identificação e genes de virulência identificados, estado de São Paulo, 2011.

Sorotipo	Identificação da amostra	Origem do animal	Tipo de amostra	Genes de virulência	Nº de isolados (%)
O4/O23	29	12	Fezes	<i>stx1</i>	1 (0,36%)
O7	12	9	Músculo interno de carcaças	<i>stx1</i>	1 (0,36%)
O22	29	12	Fezes	<i>eae</i>	1 (0,36%)
O22	29	12	Pele	<i>eae</i>	1 (0,36%)
O26	13,14 e 18	8	Pele	<i>eae</i>	8 (2,87%)
O26	14	8	Músculo externo de carcaças	<i>eae</i>	1 (0,36%)
O26	15	8	Água residuária da lavagem de carcaças	<i>eae</i>	6 (2,15%)
O26	9	–	Facas	<i>stx1</i>	1 (0,36%)
O26	14	–	Facas	<i>eae</i>	1 (0,36%)
O53	32	12	Pele	<i>eae</i> e <i>stx2</i>	1 (0,36%)
O71	29	12	Pele	<i>eae</i>	1 (0,36%)
O73	45	16	Pele	<i>eae</i>	1 (0,36%)
O75	20	10	Pele	<i>stx2</i>	1 (0,36%)
O82/NT	26	11	Fezes	<i>stx1</i>	2 (0,72%)
O113	30	12	Pele	<i>stx1</i> e <i>stx2</i>	1 (0,36%)
O116	1	1	Pele	<i>stx1</i>	1 (0,36%)
O116/NT	1	1	Fezes	<i>stx1</i>	2 (0,72%)
O141	18	8	Fezes	<i>eae</i> , <i>stx1</i> e <i>stx2</i>	1 (0,36%)
O147	11	8	Fezes	<i>stx1</i> e <i>stx2</i>	1 (0,36%)
NT	1	1	Músculo interno de carcaças	<i>stx1</i>	1 (0,36%)
NT	6	6	Pele	<i>stx2</i>	1 (0,36%)
NT	22 e 38	10 e 14	Pele	<i>stx1</i>	2 (0,72%)

Entre as culturas testadas por PCR para *E. coli* não-O157, 17 (6,10%) foram caracterizadas como *E. coli* O26 e 1 (0,36%) como O113. As culturas não sorotipadas pela PCR foram caracterizadas sorologicamente como *E. coli* O147 (0,36%), O141 (0,36%), O116 (0,36%), O116/NT (0,72%), O82/NT (0,72%), O75 (0,36%), O73 (0,36%), O71 (0,36%), O53 (0,36%), O4/O23 (0,36%), O22 (0,72%), O7 (0,36%) e não tipadas – NT (1,44%), aquelas que não aglutinaram com nenhum soro. Verifica-se ainda a presença de *E. coli* não-O157 em 32,0% (16) dos animais e em 9,52% (2) das facas (Tabela 6).

Assim como realizado por Manna et al. (2010), em um estudo de *E. coli* sorbitol-negativas provenientes de amostras de alimentos e fezes de bovinos, este estudo foi construído a princípio para identificação de *E. coli* O157:H7 sorbitol-negativa e não para todos os sorotipos de *E. coli*.

Os achados do presente estudo vão de encontro à recomendação feita por Constantiniu (2002), de submeter isolados negativos para *E. coli* O157:H7 a testes para as *E. coli* não-O157. O autor descreveu que isolados de pacientes com CH e SHU negativos para a *E. coli* O157:H7 foram positivos para *E. coli* não-O157, e que entre mais de 200 sorotipos de *E. coli* não-O157, mais de 100 deles foram associados a CH e SHU, principalmente os sorotipos O26, O103, O111 e O145.

De acordo com Mathusa et al. (2010), Grant et al. (2011), Joris et al. (2011) e Paddock et al. (2012), a estimativa real da porcentagem de isolamento de STEC não-O157 é dificultada, pois as cepas geralmente não são submetidas a testes rotineiros e o método de isolamento não é padronizado, como ocorre com a *E. coli* O157:H7.

Mathusa et al. (2010), relataram que cerca de 20 a 50% das infecções causadas por STEC podem ser atribuídas a STEC não-O157 e a diferença nas porcentagens ocorre entre países e entre regiões de um país.

Em relação ao local de isolamento das culturas do presente estudo e aos genes de virulência, um isolado (0,36%) de *E. coli* O4/23 proveniente de fezes apresentou o gene *stx1*, um (0,36%) de *E. coli* O7 de músculo interno da carcaça apresentou o gene *stx1*, dois (0,72%) de *E. coli* O22 provenientes de pele e de fezes apresentaram o gene *eae*, 16 (6,10%) de *E. coli* O26 provenientes de pele, músculo externo da carcaça, água residuária da carcaça e faca apresentaram o gene *eae*, um (0,36%) isolado desse sorotipo proveniente de faca apresentou o gene *stx1*, um (0,36%) de *E. coli* O53 de pele apresentou os genes *eae* e *stx2* concomitantemente, um (0,36%) de *E. coli* O71 de pele apresentou o gene *eae*, um (0,36%) de *E. coli* O73 de pele apresentou o gene *eae*, um (0,36%) de *E. coli* O75 de pele apresentou o gene *stx2*, dois (0,72%) de *E. coli* O82/NT de fezes apresentaram o gene *stx1*, um (0,36%) de *E. coli* O113 de pele apresentou os genes *stx1* e *stx2*, um (0,36%) de *E. coli* O116 de pele apresentou o gene *stx1*, um (0,36%) de *E. coli* O116/NT de fezes apresentou o gene *stx1*, um (0,36%) de *E. coli* O141 de fezes apresentou os genes

*eae*, *stx1* e *stx2*, um (0,36%) de *E. coli* O147 de fezes apresentou os genes *stx1* e *stx2*, e quatro (1,44%) de *E. coli* NT, sendo um (0,36%) de músculo interno da carcaça apresentando o gene *stx1*, um (0,36%) de pele apresentando o *stx2* e dois (0,72%) de pele apresentando o *stx1* (Tabela 6).

As *E. coli* O147, O141, O113, O116, O82, O75, O73, O71, O53, O26, O23, O22, O7, O4 e NT encontradas neste estudo, já foram isoladas anteriormente em humanos, bovinos e alimentos de origem animal, e classificadas como *E. coli* não-O157 (BETTELHEIM, 1978; CONSTANTINIU, 2002). Entre elas, encontram-se os sorotipos O26 e O113, considerados patógenos emergentes, responsáveis por surtos de doença de origem alimentar em diversos países (MATHUSA et al., 2010; JORIS et al., 2011; MONAGHAN et al., 2011).

Entre as *E. coli* não-O157, como as isoladas neste estudo, a O116, já foi detectada em queijo, a O75 em carne de carneiro, a O26 em leite e queijo, a O22 e O113 em carne, leite e salsicha, a O82, O73, O71 e O23 em carne, e as NT em diversos alimentos como carne bovina, carne suína, carne de carneiro, leite, queijo e salsicha (CONSTANTINIU, 2002).

Alguns dos sorotipos apresentados na Tabela 6 foram relatados anteriormente associados a doenças nos animais, como o O26, que em conjunto com o O5, O103:H2, O111 e O145 estão entre as STEC responsáveis por causar doenças em bovinos, e o O141, que juntamente com as STEC O138 e O139 são associados a doença do edema em suínos, frequentemente relacionados a casos fatais (CONSTANTINIU, 2002).

Os sorotipos O22, O23, O26, O75, O113 e NT como os encontrados neste estudo, foram descritos em pacientes com SHU. Esses sorotipos e os sorotipos O82, O113 e O141 foram associados a casos de diarreia, colite hemorrágica, dor abdominal, colite ulcerativa ou púrpura trombocitopênica trombótica, e o O26, O55, O11, O126, O127 e O128 a gastroenterite infantil (BETTELHEIM, 1978; CONSTANTINIU, 2002; HUSSEIN, 2007).

A presença de *E. coli* patogênicas já foi descrita em adultos e bebês saudáveis, em adultos e bebês diarreicos, em infecções do trato urinário e partes do corpo humano, como mãos, pele e boca, em bovinos, suínos e frangos, e também em ambientes, como ambiente hospitalar, incluindo fômites, uniformes e

equipamentos, e ambiente animal, incluindo utensílios utilizados em frigoríficos (BETTELHEIM, 1978).

Os resultados verificados neste estudo levam à mesma preocupação de Hussein (2007), que em um estudo sobre prevalência e patogenicidade de STEC em gado bovino e seus produtos, considerou que as *E. coli* patogênicas são um perigo à saúde humana, principalmente quando os humanos entram em contato com animais portadores ou quando ingerem alimentos contaminados.

Assim, alguns dos isolados de *E. coli* não-O157 encontrados neste estudo, pertencem a sorotipos isolados anteriormente em bovinos, carne e derivados e relatados como não patogênicos, porém também já foram associados a doenças. Isto indica que há o risco dos sorotipos encontrados causarem doença, tornando-se um risco à saúde dos animais, se a prevenção e o controle não forem realizados na propriedade rural, permitindo a transmissão entre eles, e um risco à saúde humana, se os microrganismos presentes nos animais forem transmitidos entre as etapas do fluxograma do abate ou colonizarem superfícies de equipamentos e utensílios no frigorífico, contaminando a carne, e também por contato direto das pessoas com os animais portadores.

O fato de os bovinos serem reservatórios de *E. coli* patogênicas é importante e continua a ser um desafio para a indústria frigorífica, principalmente no que diz respeito à segurança higiênico-sanitária da carne (HUSSEIN, 2007).

A Tabela 7 mostra a identificação de isolados de *E. coli* O26 e dos genes de virulência, nas amostras de diferentes produtos ou locais, colhidas no fluxograma de abate bovino.

**Tabela 7.** Identificação de isolados de *E. coli* O26 e dos genes de virulência, por meio da PCR, em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Tipo de amostra	Genes de Virulência	Nº de isolados de <i>E. coli</i> O26 (%)
Pele	<i>eae</i>	8 (47,06%)
Água residuária de lavagem de carcaças	<i>eae</i>	6 (35,29%)
Músculo externo de carcaças	<i>eae</i>	1 (5,88%)
Faca	<i>eae</i>	1 (5,88%)
Faca	<i>stx1</i>	1 (5,88%)
Total		17 (100,0%)



De 279 isolados, 17 (6,10%) foram identificados como *E. coli* O26. Em relação aos genes de virulência e o local de isolamento, dentre as 16 (94,12%) culturas contendo o gene *eae*, 8 (47,06%) foram isoladas de amostra de pele, 6 (35,29%) de água residuária da lavagem de carcaças, 1 (5,88%) de músculo externo de carcaça e 1 (5,88%) de faca. O único isolado (5,88%) contendo o gene *stx1* foi identificado na faca (Tabela 7).

Mora et al. (2005), avaliando a resistência antimicrobiana de cepas de STEC O157:H7 e não-O157 isoladas de humanos, bovinos, ovelhas e alimentos na Espanha, verificaram entre 722 isolados de STEC, 20,0% (141) de *E. coli* O157:H7 e 80% de *E. coli* não-O157. Os isolados de *E. coli* O157:H7 provenientes de bovinos, apresentaram os genes *stx2* e *eae* em 56% e 100% das amostras, respectivamente, diferentemente deste estudo (Tabela 4), que verificou *stx2* e *eae* em 1,89% e 16,98%, respectivamente, e *stx2* e *eae* concomitantemente em 81,13%. Os autores também relataram isolados de *E. coli* não-O157 provenientes de bovinos apresentando os genes *stx2* e *eae* em 54% e 17% das amostras, respectivamente, diferentemente deste trabalho (Tabela 7), que obteve ausência e 94,12% nas amostras de *E. coli* O26, respectivamente.

Thomas et al. (2012), no intuito de rastrear diversos sorotipos de *E. coli* em etapas do abate bovino no Irã, encontraram na *E. coli* O157:H7 os genes *stx1* em 1,8% dos isolados, *stx2* em 65,9%, *eae* e *stx2* concomitantemente em 81,2%, e ausência do *eae*, diferentemente deste estudo (Tabela 4), que verificou a ausência do gene *stx1*, porcentagens menores para o *stx2* (1,89%) e semelhante para o *eae* e *stx2* associados (81,13%), e presença isolada do *eae* (16,98%).

Thomas et al. (2012) em *E. coli* O26, verificaram a presença dos genes *stx1* em 11,6% dos isolados, *eae* em 88,4% e *stx1* e *stx2* associados em 7,1%, diferentemente deste estudo (Tabela 7), que verificou porcentagens menores de *stx1* (5,88%), maiores de *eae* (94,12%) e ausência de *stx1* e *stx2* associados.

A presença da bactéria em facas usadas durante o processo de esfolagem mostra que este objeto não está sendo esterilizado de maneira correta conforme a legislação vigente (BRASIL, 2005), que preconiza a esterilização das facas por 20 segundos a 82°C, no mínimo, após cada operação.



A esfolação é um local em que há o risco de contaminação da carcaça por microrganismos presentes na pele do animal e também de transmissão dos microrganismos entre os animais. Isto ocorre principalmente se as facas utilizadas durante o processo não forem trocadas entre o corte da pele e a esfolação, como também se a troca do objeto não for realizada entre um animal e outro ou a esterilização não for realizada de maneira correta, concordando com Elder et al. (2000) que indicaram o processo de pré-evisceração como um ponto crítico de controle para a contaminação das carcaças, em que estratégias de intervenção poderiam ser implementadas, e que a pele dos animais pode contribuir para a contaminação da carcaça.

A pele dos animais também foi relatada como importante fonte de contaminação de carcaças por Hussein (2007), em um trabalho sobre STEC em bovinos, carne e derivados, descrevendo que a *E. coli* O157:H7 e não-O157 podem ser facilmente transferidas da pele dos bovinos para a carcaça, e o lugar e a extensão da contaminação da carcaça afeta a prevalência das bactérias nos produtos cárneos.

A prevalência de *E. coli* O157:H7, O26 e O113 nas amostras de diferentes produtos ou pontos, colhidas no fluxograma de abate bovino é apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8.** Prevalência de *E. coli* O157:H7, O26 e O113 em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Tipo de amostra (Total colhido)	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> O26	<i>E. coli</i> O113
	Número de animais (%)	Número de amostras (%)	Número de amostras (%)
Pele (50)	1 (2,0%)	2 (4,0%)	–
Fezes (50)	3 (6,0%)	–	1 (2,0%)
Pele e Fezes (50)	2 (4,0%)	–	–
Água residuária de lavagem de carcaças (50)	–	1 (2,0%)	–
Pele e músculo externo de carcaças (50)	–	1 (2,0%)	–
Facas (21)	–	2 (9,52%)	–
Total nas amostras obtidas de animais	6 (12,0%)	4 (8,0%)	1 (2,0%)
Total nas amostras de facas	–	2 (9,52%)	–

Correlacionando os resultados encontrados com os 50 animais amostrados, a *E. coli* O157:H7 foi identificada em seis (12,0%) deles, presentes nas fezes de três (6,0%), na pele de um (2,0%) e concomitantemente nas fezes e pele de dois (4,0%) (Tabela 8).

Ainda, a *E. coli* O26 foi identificada em quatro (8,00%) deles, sendo distribuídas na pele de dois (4,0%), na pele e no músculo externo da carcaça concomitantemente de um (2,0%) e na água residuária da lavagem da carcaça de um (2,0%). Este sorotipo também foi identificado em duas (9,52%) das 21 facas analisadas. Apenas uma cultura de *E. coli* O113 foi isolada nas fezes de um (2,0%) dos 50 animais (Tabela 8).

Prevalências menores em relação à deste estudo, realizado em matadouro-frigorífico para o sorotipo O157:H7/H<sup>-</sup> (0,23%) e O26 (0,14%), foram relatadas por Buvens et al. (2012), ao estudar a incidência e os determinantes de virulência de STEC em casos de infecções em humanos na Bélgica. As comparações com casos clínicos em humanos se deve ao fato da escassez de dados a respeito desses sorotipos em matadouro-frigorífico.

Thomas et al. (2012), no intuito de rastrear diversos sorotipos de *E. coli* em etapas do abate bovino no Irã, verificaram prevalência de *E. coli* O157 de 18,9% nas amostras de pele, de 2,7% nas de fezes, 0,7% nas carcaças pré-evisceradas e 0,7% nas carcaças após a lavagem. Em relação a este estudo, as porcentagens foram menores para as amostras de pele (2,0%) e maiores para as de fezes (6,0%). Os autores também identificaram o sorotipo O26 em 0,2% das amostras de pele, 1,5% das de fezes e em nenhuma carcaça, diferenciando-se deste estudo, que mostrou a presença da bactéria em 6,0% das amostras de pele, nenhuma amostra de fezes e 2,0% das amostras de músculo externo da carcaça.

Entre as *E. coli* não-O157 pesquisadas nos 50 animais, a mais prevalente foi a *E. coli* O26 (8,0%) (Tabela 5 e 8), concordando com alguns estudos (FRIEDRICH et al., 2002; O'REILLY et al., 2010; JORIS et al., 2011; PADDOCK et al., 2012) e diferenciando de outros, como um realizado no Brasil com gado leiteiro no Estado de São Paulo, no qual a *E. coli* O113 foi caracterizada como a mais frequente (IRINO et al., 2005), e outro na Irlanda, realizado com amostras colhidas em etapas do abate

bovino, que obteve o sorotipo O103 (82,6%) como o mais prevalente (THOMAS et al., 2012).

A divergência na prevalência das *E. coli* não-O157 entre os estudos pode ser devida a variações na metodologia empregada, já que a técnica de isolamento não é padronizada, corroborando com conclusões de Joris et al. (2011) e Paddock et al. (2012). A falta de padronização da técnica de isolamento também faz com que o número de relatos de *E. coli* O157:H7 seja maior que o de não-O157, o que leva a subestimar o número de STEC não-O157 e a não identificação do sorotipo mais importante (GRANT et al., 2011).

Segundo o CDC, há uma necessidade em desenvolver a metodologia de isolamento das *E. coli* não-O157 e de detectar o potencial delas para causar doenças severas, pela identificação dos genes de virulência, para que o paciente infectado seja tratado rapidamente, evitando complicações graves (MATHUSA et al., 2010).

A Tabela 9 mostra a distribuição de genes de virulência de *E. coli* patogênicas, nas amostras de diferentes produtos ou pontos, colhidas de 50 animais e de 21 facas no fluxograma de abate bovino.

**Tabela 9.** Distribuição de genes de virulência identificados por PCR em *E. coli* patogênicas, isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Tipo de amostra (Total colhido)	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>E. coli</i> O26		<i>E. coli</i> O113	
	Genes de virulência	Nº de animais (%)	Genes de virulência	Nº de amostras (%)	Genes de virulência	Nº de amostras (%)
Fezes (50)	<i>eae</i>	2 (4,0%)	–	–	<i>stx1</i> e <i>stx2</i>	1 (2,0%)
	<i>eae</i> e <i>stx2</i>	5 (10,0%)	–	–	–	–
Pele (50)	<i>eae</i>	1 (2,0%)	<i>eae</i>	3 (6,0%)	–	–
	<i>stx2</i>	1 (2,0%)	–	–	–	–
	<i>eae</i> e <i>stx2</i>	1 (2,0%)	–	–	–	–
Músculo externo de carcaças (50)	–	–	<i>eae</i>	1 (2,0%)	–	–
Água residuária de lavagem de carcaças (50)	–	–	<i>eae</i>	1 (2,0%)	–	–
Facas (21)	–	–	<i>eae</i>	1 (4,76%)	–	–
	–	–	<i>stx1</i>	1 (4,76%)	–	–

*E. coli* O157:H7 contendo o gene *eae* estava presente em três (6,0%) animais, sendo localizada nas fezes de 2 (4,0%) deles e na pele de 1 (2,0%). O mesmo sorotipo contendo o gene *stx2* foi identificado na pele de 1 (2,0%) animal e o *eae* e *stx2*, concomitantemente, em 6 (12,0%) animais, localizados nas fezes de 5 (10,0%) e na pele de 1 (2,0%) (Tabela 9).

*E. coli* O26 contendo o gene *eae* estava presente em quatro (8,0%) animais, sendo localizada na pele de três (6,0%), no músculo externo da carcaça de um (2,0%) e na água residuária da carcaça de outro (2,0%). Ainda, este sorotipo contendo o gene *eae* foi identificado em uma (4,76%) amostra de faca e o gene *stx1* em outra (4,76%). A única (2,0%) *E. coli* O113 isolada nas fezes, apresentou os genes *stx1* e *stx2* (Tabela 9).

Monaghan et al. (2011) identificaram 42,0% de isolados de *E. coli* não-O157 em amostras de fezes de bovinos apresentando o gene *stx2*, 36,0% delas o *stx1* associado ao *stx2* e 22,0% delas somente o *stx1*, valores maiores que os apresentados neste estudo para o gene *stx1*.

Neste estudo, houve a presença de STEC O157:H7 em 6 (12,00%) e *E. coli* O157:H7 com comportamento de EPEC em 3 (6,0%) dos 50 animais, valor menor que o encontrado por Kappeli et al. (2011), que obtiveram STEC O157:H7 em 100% das amostras provenientes de casos clínicos na Suíça. Também houve a presença de STEC O26 em apenas 1 (4,76%) amostra de faca, sendo a maioria delas, ou seja, 4 (8,0%) de animais e 1 (4,76%) de faca, classificadas como EPEC devido à presença do gene *eae*. A STEC O113 foi verificada em 1 (2,0%) animal (Tabelas 5 e 9).

O aparecimento de EPEC O157:H7 pode ser explicado pela perda do gene *stx2* em alguns dos isolados *eae* positivos, levando a uma diferenciação no perfil de virulência de STEC para EPEC (Tabela 5).

Alguns autores (KARCH et al., 1992; SCHMIDT et al., 1999; FENG et al., 2001; BUVENS et al., 2012) indicaram que a perda do *stx* não é um fato comum relacionado à *E. coli* O157:H7, mas que pode ocorrer. Os estudos atribuíram a perda do gene aos processos de culturas, mostrando que em pacientes infectados o diagnóstico pode ser dificultado, pois os organismos que antes apresentavam toxinas Shiga passaram a ser não toxigênicos. Contudo, não é possível determinar

se os isolados são inerentemente *stx*-negativos ou se eles perderam os genes *stx* durante a cultura (JORIS et al., 2011).

A mudança no comportamento das *E. coli* O26 de STEC para EPEC também pode ser justificada pela possível perda do gene *stx* durante o plaqueamento ou pela ocorrência de mutações que não permitem a expressão do gene (FRIEDRICH et al., 2002, BUVENS et al., 2012; JORIS et al., 2011), modificando assim seu perfil de virulência, uma vez que diversas pesquisas (VAZ et al., 2004; MONAGHAN et al., 2011; GRANT et al., 2011; JORIS et al. 2011; CHASE-TOPPING et al., 2012) relataram a presença dos genes *stx*, em especial o *stx1*, como principal perfil de virulência.

Joris et al. (2011), verificando a presença de *E. coli* não-O157 em abatedouro bovino na Bélgica, encontraram STEC O26 em 66,67% das fezes de animais e EPEC O26 presentes em 33,33%, ao contrário deste estudo, cujo sorotipo estava ausente nas amostras de fezes. Paddock et al. (2012), verificando a aplicabilidade da PCR multiplex para detectar *E. coli* não-O157 e O157 em bovino, também encontraram apenas uma amostra de STEC O26 positiva para *stx1*.

Concordando com este estudo, Sasaki et al. (2011) relataram que a ausência do *stx* nas *E. coli* O157 e O26 era mais comum que a presença de STEC O157 e O26, em um estudo sobre a prevalência e a caracterização de *E. coli* O157 e O26 produtoras de toxinas Shiga em fazendas de gado de corte no Japão. Os autores verificaram nas fezes dos bovinos prevalências de 8,9% e 0,4% de STEC O157 e O26, respectivamente, e de 9,2% e 0,98% de EPEC O157 e O26, respectivamente, porcentagens maiores de EPEC O157 (14,0%) e menores de STEC O157 (10,0%) e EPEC O26 (0%), em relação a este estudo (Tabela 9).

O'Reilly et al. (2010), em um estudo sobre a associação entre os determinantes de virulência e a epidemiologia de *E. coli* zoonóticas na Escócia, também encontraram uma baixa prevalência (4,1%) de *E. coli* O26 isolada nas fezes de bovinos e maior porcentagem (44,98%) desse sorotipo contendo somente o gene *eae*, quando comparado a este trabalho em que o gene esteve ausente em isolado de fezes.

Essa mudança no perfil de virulência das culturas ainda não é um fato esclarecido, mas poderia ser justificado pelas mutações nos códons que não

permitem a expressão da proteína do gene (FRIEDRICH et al., 2002). A perda ou adesão de alguns genes pode ocorrer em algumas cepas de *E. coli*, que são conhecidas por ter uma boa capacidade de realizar transferência horizontal de genes, para aumentar a diversidade genética. A emergência de variantes altamente patogênicas, pode ser devido as cepas virulentas de *E. coli* O157 e não-O157 serem reservatórios potenciais de genes de virulência que realizam a transferência para outras cepas (MANNA et al., 2010).

Mudanças nas características de virulência de cepas também podem afetar a transmissão do patógeno no rebanho e, portanto, representar uma ameaça ao ser humano pelo aumento na prevalência de bactérias (CHASE-TOPPING et al., 2012).

A ausência de *eae* é uma característica comum associada a *E. coli* O113, fato confirmado por alguns pesquisadores (BEUTIN et al., 1998; PATON et al., 1999; MONAGHAN et al.; 2011). A *E. coli* O113:H21 não possui a ilha de patogenicidade LEE responsável por causar doenças, porém os casos de doenças relacionados a este sorotipo foram relatados como sendo tão severos quanto aqueles causados por *E. coli* O157:H7 (MATHUSA et al., 2010). O sorotipo O113 também foi encontrado por Monaghan et al. (2011) em um estudo de STEC não-O157 isoladas de bovinos, com prevalência de 29,0%, bem maior que os 2,0% encontrados neste trabalho.

Beutin et al. (1998), examinando STEC causadoras de diarreia, SHU ou outras complicações, verificaram a presença de *stx1* e *stx2* em *E. coli* O113. A *E. coli* O113 sem a presença do *eae* foi relatada como responsável por três casos de SHU, em um estudo sobre a caracterização molecular de *E. coli* O113:H21 na Austrália (PATON et al., 1999), mostrando que o isolado encontrado neste estudo também pode ser capaz de causar doença.

Outra mudança pode ser verificada no comportamento das cepas de *E. coli* O26, sendo isolada pela primeira vez *E. coli* O26 sorbitol-negativa com comportamento de EPEC (Tabelas 5 e 6). A *E. coli* O113 e outros sorotipos descritos na Tabela 6, também sofreram mudanças, pois estes sorotipos sabidamente fermentadores do sorbitol apresentaram-se como sorbitol-negativos. A maioria das *E. coli* não-O157 fermentam o sorbitol, exceto aproximadamente 6,0% que são considerados isolados atípicos (SHAH et al., 2010; BUVENS et al., 2012).



Assim como nesse estudo, outras pesquisas envolvendo bovinos também detectaram os sorotipos O7, O26, O73, O75, O82, O113 e NT sorbitol-negativos, e também outros como O2, O5, O8, O39, O48, O88, O132, O142 e O171 (ARTHUR et al., 2002; HORNITZKY et al., 2005; MANNA et al., 2010), e *E. coli* O157:H<sup>-</sup> e STEC não-O157 fermentadoras de sorbitol provenientes de casos clínicos em humanos (FRIEDRICH et al., 2002; BUVENS et al., 2012).

Buven et al. (2012) encontraram 18 (16,8%) de 107 isolados de *E. coli* não-O157 sorbitol-negativas colhidas de fezes humanas na Bélgica, utilizando também o ágar CT-SMAC para o isolamento. Contudo os autores citados não descreveram o sorotipo identificado.

Uma vez que a metodologia de isolamento das *E. coli* não-O157 não é padronizada e havendo limitações para comparar os resultados dos diversos estudos realizados, a informação de que há relatos de bactérias deste grupo sorbitol-negativas é importante e se torna útil na padronização da técnica.

Além disso, a perda do gene *stx* das *E. coli* e a presença de *E. coli* não-O157 sorbitol-negativa relatadas neste estudo, reforça a dificuldade em identificá-las em alimentos e em casos clínicos, já que utiliza-se a produção de *stx* pelos diversos sorotipos e a não fermentação do sorbitol pela *E. coli* O157:H7 na diferenciação entre *E. coli* patogênicas das *E. coli* não-patogênicas, concordando com Grant et al. (2011) em um estudo sobre STEC não-O157.

Este estudo confirma o realizado por Manna et al. (2010), sobre a distribuição de sorogrupos e características de virulência de *E. coli* sorbitol-negativa provenientes de alimentos e fezes de bovinos, que descreveram que as *E. coli* não-O157 sorbitol-negativas, são frequentemente isoladas nas fezes de animais e em ambientes, não sendo uma característica exclusiva da *E. coli* O157:H7, dificultando a identificação do fenótipo e também do sorotipo, sendo necessário o desenvolvimento de um meio de cultura diferencial para aumentar a probabilidade de identificar um determinado sorotipo.

A presença de isolados de *E. coli* não-O157 sorbitol-negativos pode estar associada à ausência da enzima  $\beta$ -D-glucuronidase, demonstrado por alguns estudos (RICE et al., 1990; HANCOCK et al., 1997, MANNA et al., 2010), porém a

utilização do sorbitol e atividade de  $\beta$ -D-glucuronidase, não são testes definitivos para identificação de *E. coli* O157 (MANNA et al., 2010) e não-O157.

Sendo assim, além da necessidade da descoberta de uma metodologia de identificação mais eficiente em relação ao sorotipo, nota-se que a associação da PCR à metodologia de isolamento realizado neste estudo, é muito importante para a confirmação do sorotipo.

Outro achado interessante neste trabalho foi o comportamento das culturas frente aos testes bioquímicos, com a presença de 1 (1,89%) e 2 (11,76%) culturas atípicas de *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O26, respectivamente. Apesar da baixa porcentagem, verifica-se novamente uma diferenciação no comportamento das bactérias, o que leva a duvidar da eficiência de usar testes bioquímicos no processo de isolamento sem a associação com a biologia molecular, necessitando de outros estudos para a comprovação desse fato.

Algumas culturas representando as amostras de *E. coli* O157:H7, O26 e O113 isoladas neste estudo foram escolhidas para a identificação de outros genes de virulência, no intuito de avaliar o potencial patogênico dos isolados, uma vez que não é somente a identificação do sorotipo e a presença de *stx*, sem outros fatores de virulência, que confere patogenicidade imediata às *E. coli* (HUSSEIN, 2007; MATHUSA et al., 2010; GRANT et al., 2011).

Verifica-se a identificação dos isolados de *E. coli* O157:H7 e O26, respectivamente nas Tabelas 10 e 11, de acordo com patotipo, sorotipo, local de isolamento, propriedade rural, número de isolados e perfil de virulência, nas amostras de diferentes produtos ou pontos, colhidas no fluxograma do abate bovino.



**Tabela 10.** Identificação dos isolados de *E. coli* O157:H7 de acordo com patotipo, sorotipo, propriedade rural, número de isolados, perfil de virulência e tipo de amostra colhida no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Patotipo/ Sorotipo	Tipo de amostra	Nº da amostra	Propriedade rural	Nº de isolados (%)	Nº de isolados (%)		Perfil de virulência				
					<i>eae</i>	<i>stx2/variantes</i>	<i>EHEC-hly</i>	<i>efa-1</i>	<i>paa</i>	<i>fepC</i>	<i>lpf<sub>O141</sub></i>
STEC/ EPEC O157:H7	Fezes	3	2	1	1	1/A e C	+	+	+	-	+
	Fezes	18	3	13	13	13/A	+	+	+	+	+
	Fezes	29	5	10	10	5/ C	+	+	+	-	+
	Pele	29	5	1	1	1	+	+	+	-	+
	Fezes	30	5	3	3	1/C	+	+	+	-	+
	Pele	31	5	6	5	4/C	+	+	+	-	+
	Fezes	45	6	18	18	18/A	+	+	+	-	+
	Pele	45	6	1	1	1	+	+	+	-	+
Total				53 (19,00%)	52 (18,64%)	44 (15,78%)					

**Tabela 11.** Identificação dos isolados de *E. coli* O26 de acordo com patotipo, sorotipo, propriedade rural, número de isolados, perfil de virulência e tipo de amostra colhida no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Patotipo/ Sorotipo	Tipo de amostra	Nº da amostra	Propriedade rural	Nº de isolados (%)	Nº de isolados (%)		Perfil de virulência				
					<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>efa-1</i>	<i>paa</i>	<i>fepC</i>	<i>lpf<sub>O113</sub></i>	<i>lpf<sub>O26</sub></i>
EPEC/ STEC O26	Pele	13	3	1	1	0	+	+	-	+	+
	Músculo externo de carcaças	14	3	1	1	0	+	+	-	+	+
	Pele	14	3	4	4	0	+	+	-	+	+
	Água residuária da lavagem de carcaças	15	3	6	6	0	+	+	-	+	+
	Pele	18	3	3	3	0	+	+	+	+	+
	Facas	14	—	1	1	0	+	+	-	+	+
	Facas	9	—	1	0	1	-	-	-	-	-
				17 (6,10%)	16 (5,73%)	1 (0,36%)					

Os resultados mostraram que as culturas de *E. coli* O157:H7 presentes nas fezes e na pele dos animais apresentaram um perfil de virulência homogêneo com a presença dos genes *eae*, *stx2* com as variantes *stx2A* e *stx2C*, *EHEC-hly*, *paa*, *efa-1* e *lpf<sub>O141</sub>*, exceto para as fezes de um animal que também apresentou o gene *fepC* (Tabela 10).

Os isolados de *E. coli* O26 presentes na pele dos animais, no músculo externo da carcaça, na água residuária da lavagem das carcaças e em facas

também apresentaram um perfil de virulência homogêneo, com a presença dos genes *eae*, *efa-1*, *paa*, *lpf*<sub>O113</sub> e *lpf*<sub>O26</sub>, exceto para um isolado de faca, que foi positivo apenas para o *stx1*. Um isolado proveniente da pele de um animal contendo os genes *eae*, *efa-1*, *paa*, *lpf*<sub>O113</sub> e *lpf*<sub>O26</sub>, também apresentou o gene *fepC* (Tabela 11). A única (2,0%) *E. coli* O113 isolada nas fezes, apresentou o perfil de virulência composto pelo genes *stx1*, *stx2 A e C*, e *lpf*<sub>O113</sub>. (Tabelas 5 e 9).

Buven et al. (2012) ao estudarem a incidência e os determinantes de virulência de STEC em casos de infecções na Bélgica, encontraram perfil de virulência da *E. coli* O157:H7 semelhante ao encontrado neste estudo, com todos os isolados apresentando *vtx2* e *eae*, e 97,1% o *ehxA*, exceto pela presença de *vtx1* em 44,1% deles. Os autores também identificaram a *E. coli* O26 com um perfil de virulência diferente deste estudo, apresentando os genes *vtx1*, *vtx2*, *eae* e *ehxA*.

Sasaki et al. (2011), ao determinarem a prevalência e a caracterização de *E. coli* produtoras de toxina Shiga em fazendas de gado de corte no Japão, também verificaram maior frequência do gene *stx2c* e ausência de *stx2d*, *stx2e* ou *stx2f* nas cepas de *E. coli* O157. Em relação ao sorotipo O26, os autores observaram perfis de virulência divergentes ao deste estudo, com a presença dos genes *stx1*, *eae* e *hly*.

Friedrich et al. (2002) citam que as cepas de STEC provenientes de pacientes com CH ou SHU são frequentemente *stx2* e *eae* positivas e muitas delas também carregam o gene *hlyA*. De acordo com Arthur et al. (2002), independentemente do sorotipo, a combinação entre *eae*, *stx* e EHEC *hlyA* pode ser um bom indicador do potencial patogênico da cepa de STEC.

Apesar de alguns estudos apontarem a presença dos genes *stx1* e *stx2* como perfil de virulência comumente encontrado em *E. coli* O157 (CERQUEIRA et al., 1999; KAPPELI et al., 2011), outros (ELDER et al., 2000, MORA et al., 2005; SASAKI et al., 2011, PADDOCK et al., 2012 e THOMAS et al., 2012) confirmam os resultados apresentados, cujo perfil de virulência da *E. coli* O157:H7 apresenta, concomitantemente, os genes *stx2*, *eae* e *hly*, frequentemente associados a doenças em humanos, principalmente as severas (BOERLIN et al., 1999), mostrando que os isolados deste estudo possuem potencial patogênico.

Buvenis et al. (2012), estudando infecções em humanos causadas por STEC na Bélgica, encontraram isolados de *E. coli* O157:H7 *vtx2a* e *vtx2c* positivos para *eae* associados a casos de SHU e diarreia sanguinolenta.

Kappeli et al. (2011) demonstraram a toxina de shiga como responsável em produzir complicações sistêmicas, sendo a *stx2* mais prevalente em casos de SHU, ou seja, mais patogênica que a *stx1*, e entre as variantes a *stx2a* pelo menos 25 vezes mais patogênica que a *stx2c*.

Ainda pesquisas demonstraram que STEC O157 carreando somente *stx2* são mais propensas a causar complicações sistêmicas do que aquelas que possuem *stx1* e *stx2* associados (FRIEDRICH et al., 2002; FULLER et al., 2011).

Vaz et al. (2004), em um estudo retrospectivo de *E. coli* em humanos no Brasil, também verificaram a presença da *E. coli* O157:H7 com o mesmo perfil de virulência, em pessoas que manifestaram diarreia, e, assim como neste estudo, associaram a presença de *eae* com EHEC-*hlyA*.

Esta associação entre *eae* e *Ehly* também foi verificada por Beutin et al. (1998) em cepas de STEC isoladas de pacientes doentes na Alemanha, por Sasaki et al. (2011) em STEC O157 e O26 isoladas de gado de corte no Japão e por Kappeli et al. (2011) em STEC O157 isoladas de casos clínicos em humanos na Suíça.

Joris et al. (2011), isolaram *E. coli* O26 em algumas amostras de fezes de bovinos colhidas em abatedouro na Bélgica, com um perfil de virulência semelhante ao deste estudo, apresentando o gene *eae*, diferenciando-se apenas pela presença concomitante do gene *hly*. Porém, os autores encontraram ainda outros perfis de virulência contendo genes *eae*, *stx1* e *hly*; *stx1*, *eae* e *hly*; *stx2* e *hly*, e *stx1* e *stx2*.

Corroborando este trabalho, Monaghan et al. (2011) investigando sorotipos e genes de virulência de STEC não-O157 em gado de corte na Irlanda, encontraram a presença do gene *lpf*<sub>O113</sub> em *E. coli* O26.

A ausência do gene *stx* na maioria das amostras de *E. coli* O26 não as deixa menos patogênicas, fato comprovado por Beutin et al. (1998), que verificaram que a doença clínica causada por STEC não-O157 não está associada à produção de toxinas Shiga. Os autores relataram que a presença do gene *eae* foi frequentemente associada a diarreia severa e SHU, e que as cepas com ausência do gene *eae*

foram encontradas em casos clínicos menos severos, como em simples diarreias, dores abdominais e até em portadores.

Além da elevada patogenicidade, outro fato que torna a presença da *E. coli* O26 preocupante é a associação entre a presença do gene *eae* e o aumento na transmissão deste agente entre os hospedeiros, associação que, segundo O'Rilley et al. (2010), não ocorre para os genes das toxinas e sugere que a presença do *eae* pode conferir à bactéria vantagens de seleção no ambiente.

O único isolado de *E. coli* O113 apresentou perfil semelhante ao encontrado por Buvens et al. (2012) na Bélgica, ou seja a presença de *vtx2* e a ausência de *ehxA*, em sorotipo isolado de pacientes com dores abdominais.

Perfis semelhantes em relação a este estudo da *E. coli* O113 foram observados por Monaghan et al. (2011), em um estudo realizado em propriedades rurais de gado de corte na Irlanda. Os autores encontraram maior prevalência de *E. coli* O113:H4, contendo os genes *stx1* e *stx2*, diferenciando-se pela ausência do gene *lpf<sub>O113</sub>*. A *E. coli* O113 contendo os genes *stx1* e *stx2* também foi relatada por Beutin et al. (1998), examinando STEC causadoras de diarreia, SHU ou outras complicações em humanos.

*E. coli* O113 sem a presença do *eae* foi relatada como responsável por três casos de SHU, em um estudo sobre a caracterização molecular de *E. coli* O113:H21 na Austrália (PATON et al., 1999), mostrando que o isolado encontrado neste estudo também pode ser capaz de causar doença. Apesar da ausência do *eae* e presença do *stx2*, os autores observaram um perfil de virulência diferente do encontrado neste estudo, com a presença de EHEC-*hly* e ausência de *stx1*, e indicaram ainda, que os isolados de STEC desprovidos do gene *eae* eram capazes de colonizar eficientemente o intestino de humanos e também de causar SHU.

Portanto, nota-se que as cepas de *E. coli* O157:H7, O26 e O113 deste estudo podem ser beneficiadas pelos fatores de virulência em relação à prevalência das bactérias no rebanho bovino e à epidemiologia no organismo hospedeiro (O'REILLY et al., 2010; FERENS e HOVDE, 2011).

Tanto as *E. coli* O157:H7 quanto as O26 apresentaram o gene *paa* associado ao *eae*, corroborando a pesquisa de An et al. (1999) que fizeram a descoberta deste

gene e também destacaram sua importância na atividade de adesão e esfacelamento (A/E) da célula hospedeira e na destruição das microvilosidades.

O gene *fepC* também foi encontrado nas *E. coli* O157:H7 e O26 isoladas de um mesmo animal, porém foi demonstrado que, ao contrário do descrito por Ye e Shu (2001), esse gene não esteve presente em todas as amostras de *E. coli* O157:H7 contendo o gene *stx*, apenas em uma, sendo esta associação considerada estatisticamente não significativa ( $p > 0,05$ ), contrariando a ideia de que aquele gene pode ser um marcador para distinguir as *E. coli* O157:H7 que apresentam o gene *stx* daquelas que não apresentam. Esse fato também pode se estender para a *E. coli* O26, pois a única amostra que apresentou o gene *stx* não continha o gene *fepC*, e a amostra contendo este gene não apresentava o gene *stx*, apenas o gene *eae*.

Apesar de o conjunto de fatores de virulência capaz de causar doença de cada sorotipo não ser estritamente definido, porém tendo em vista as informações apresentadas, pode-se afirmar que as culturas identificadas neste estudo possuem os principais genes responsáveis por aderir à célula hospedeira e causar complicações severas e sistêmicas em humanos, podendo ser um perigo para a saúde pública se estiverem presentes na carne e forem ingeridas pelos consumidores.

Quanto à variante na metodologia de isolamento, referente ao tempo de incubação na fase de enriquecimento seletivo, observou-se maior isolamento das bactérias no período de seis horas de incubação com agitação, com seis (12,0%) animais positivos para a *E. coli* O157:H7, e três (6,0%) animais e um (4,76%) suabe de faca para a *E. coli* O26. Já, com o total de 24 horas de incubação, observou-se um número menor de isolados, com dois (4,0%) animais positivos para *E. coli* O157:H7 e um (4,76%) suabe de faca para a *E. coli* O26 (Tabela 5).

Os resultados quanto à recuperação de *E. coli* patogênicas utilizando diferentes formas de incubação mostraram que o tempo de seis horas de incubação com agitação permitiu maior número de isolados que o de 24 horas, apesar de não ser estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Nota-se, com estes resultados, a importância da incubação com agitação na fase de enriquecimento para aumentar as chances de desenvolvimento e isolamento da *E. coli*, possivelmente por diminuir

a competição com outros microrganismos contaminantes , após 24 horas no caldo de enriquecimento.

Fato semelhante foi relatado por Joris et al. (2011), que, ao estudar a ocorrência e a virulência de *E. coli* não-O157 em abatedouro bovino, verificaram, por plaqueamento direto, sete (1,75%) amostras positivas após seis horas de incubação em caldo de enriquecimento, e apenas quatro (1,0%) em 24 horas.

A Tabela 12 apresenta a identificação de *E. coli* patogênicas isoladas em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, de acordo com a propriedade rural, cidade, estado, patotipo e sorotipo.

**Tabela 12.** Identificação de *E. coli* patogênicas, isoladas em amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, de acordo com a propriedade rural, cidade, estado, patotipo e sorotipo, estado de São Paulo, 2011.

Propriedade rural	Cidade-Estado	Patotipo	Sorotipo	Identificação da amostra
1	Mira-Estrela-SP	STEC	O116	1
			O116/NT <sup>*</sup>	1
			NT	1
3	Auriflamma-SP	STEC	O157:H7	3
6	Frutal-MG	STEC	NT	6
8	Rifaina-SP	STEC	O141	18
			O147	11
			O157:H7	18
		EPEC	O26	13, 14, 15 e 18
9	Frutal-MG	STEC	O7	12
10	Catalão-GO	STEC	O75	20
			NT	22
11	Itobi-SP	STEC	O82	26
12	São João da Boa Vista-SP	STEC	O4/O23	29
			O53	32
			O113	30
			O157:H7	29, 30 e 31
			EPEC	O22
			O71	29
			O157:H7	29, 30 e 31
14	Frutal-MG	STEC	NT	38
16	Cardoso-SP	STEC	O157:H7	45
			EPEC	O73

NT – não tipadas.

Os isolados deste estudo foram obtidos de animais provenientes de 17 propriedades rurais, sendo distribuídas 11 no estado de São Paulo, cinco em Minas Gerais e uma em Goiás (Tabela 12).

De acordo com a Tabela 12, a propriedade rural 1 apresentou STEC O116, O116/NT e NT no animal 1, a propriedade rural 3 apresentou STEC O157:H7 no animal 3, a propriedade rural 6 apresentou STEC NT no animal 6, a propriedade rural 8 apresentou STEC O141 e O157:H7 no animal 18 e O147 no animal 11, e EPEC O26 nos animais 13, 14, 15 e 18, a propriedade rural 9 apresentou STEC O7 no animal 12, a propriedade rural 10 apresentou STEC O75 e NT, respectivamente, nos animais 20 e 22, a propriedade rural 11 apresentou STEC O82 no animal 26, a propriedade rural 12 apresentou STEC O4/O23 no animal 29, O53 no animal 32, O113 no animal 30 e O157:H7 nos animais 29,30 e 31, e EPEC O22 e O71 no animal 29 e O157:H7 nos animais 29, 30 e 31, a propriedade rural 14 apresentou STEC NT no animal 38 e a propriedade rural 16 apresentou STEC O157:H7 e EPEC O73 no animal 45.

Verifica-se que de quatro sorotipos encontrados em cinco animais provenientes da propriedade rural 8, três (STEC O141 e O157:H7, e EPEC O26) foram isolados do animal 18. De sete sorotipos isolados em quatro animais provenientes da propriedade rural 12, cinco (STEC O4/O23, STEC/EPEC O157:H7, EPEC O22 e EPEC O71) foram isolados do animal 29, dois (STEC O113 e STEC/EPEC O157:H7) do animal 30 e um (STEC/EPEC O157:H7) do animal 31. Ainda, na propriedade rural 16 foram isolados dois sorotipos (STEC O157:H7 e EPEC 73) do animal 45 (Tabela12).

As *E. coli* O157:H7, O26 e O113 consideradas emergentes, foram encontradas, respectivamente, em quatro (36,36%), uma (9,09%) e uma (9,09%), das 11 propriedades rurais do estado de São Paulo. O fato de não ter sido isolada *E. coli* patogênicas em animais provenientes de propriedades rurais dos estados de Minas Gerais e Goiás não significa que elas estejam livres dessas bactérias, pois como as coletas das amostras deste estudo foram realizadas em dias comuns de trabalho e, no intuito de não modificar as condições normais do processamento de abate, os animais foram escolhidos de acordo com a possibilidade de colher o conteúdo intestinal, por isso não foi colhido um número pré-determinado de animais



provenientes da mesma propriedade rural e estado. Portanto, seria interessante realizar pesquisas mais abrangentes no sentido de verificar qual a real disseminação desta bactéria nos diferentes estados do Brasil.

Esses resultados mostram que um único animal pode carrear diversos sorotipos de *E. coli* patogênicas, podendo transmiti-las ao ambiente, a outros animais ou aos seres humanos, permitindo a distribuição, manutenção e até aumento da prevalência de bactérias nas propriedades rurais.

A transmissão das bactérias presentes nas fezes dos animais pode ser realizada por contato direto entre os animais ou entre animais e humanos, ou por contato dos animais com ambientes contaminados, como currais, estábulos, bebedouros, comedouros, solo e pastagem.

Constantiniu (2002), Ferens e Hovde (2011) e Grant et al. (2011), informaram que o ambiente é cada vez mais importante na epidemiologia de STEC O157 e não-O157, em relação a persistência do patógeno fora do animal reservatório, favorecendo a presença delas em veículos e a contaminação de alimentos, água, animais e humanos. Esses autores também descreveram que as STEC podem sobreviver nas fezes, na madeira, em aço inoxidável, na palha, em concreto, em metal, no solo e na vegetação das propriedades rurais, e também serem levadas pela chuva até águas superficiais ou profundas, onde podem persistir por longos períodos, variando de semanas ou meses.

A sobrevivência das *E. coli* patogênicas nas águas é muito importante, pois pode contaminar águas subterrâneas, águas de irrigação ou águas utilizadas na produção dos animais (GRANT et al., 2011), contaminando conseqüentemente superfícies de equipamentos e objetos lavados, vegetais irrigados, animais e humanos. A *E. coli* O157:H7 pode sobreviver de dias até meses na água de propriedades rurais (FERENS e HODVE, 2011).

Além da preocupação em disseminar, manter e aumentar a prevalência de *E. coli* patogênicas na propriedade rural, a presença de animais portadores na propriedade pode também causar doença em outros animais ou em seres humanos por contato direto, ou transportar os microrganismos até o frigorífico, facilitando a entrada no ambiente de abate, podendo contaminar a carne e causar danos à saúde dos consumidores, dependendo dos fatores de virulência que o sorotipo apresenta.



Outra possibilidade é o caminhão de transporte dos animais não ser higienizado corretamente e carrear algum sorotipo patogênico a outra propriedade, disseminando as bactérias entre as propriedades rurais.

O'Rilley et al. (2010) mostraram que pode haver transmissão contínua do sorotipo O26 entre animais, e Sasaki et al. (2011) sugeriram que STEC O157 excretada por um animal pode infectar o outro na propriedade rural e também citaram a disseminação por cães e gatos, uma vez que eles andam livremente pelos locais.

Assim, além dos bovinos, outros animais nas propriedades rurais podem ser infectados por *E. coli* patogênicas e se tornarem reservatório. A *E. coli* O157:H7 já foi isolada em cabras, ovelhas, suínos, perus, frangos, e, ocasionalmente, em animais domésticos, pássaros, roedores, animais selvagens, anfíbios, peixes e invertebrados, como moluscos e insetos (FERENS e HODVE, 2011).

Estudos mostram que a taxa de excreção de STEC nas fezes varia de animal para animal e valores maiores que  $10^6$  UFC/g pode resultar em contaminação e disseminação imediata no ambiente e nas águas (HUSSEIN, 2007; GRANT et al., 2011).

A excreção das bactérias pelos animais pode variar entre as propriedades rurais, mas geralmente é maior durante o verão e menor no inverno, sendo o verão o período em que também são relatados mais casos de surtos de doenças nos humanos (HUSSEIN, 2007; MATHUSA et al., 2010; FERENS e HOVDE, 2011). Em função do Brasil ter um clima tropical, pode ser que a excreção dos microrganismos ocorra na maior parte do ano quando comparado aos países europeus que possuem as estações climáticas mais definidas. A prevalência das bactérias é maior em bezerros e novilhas desmamadas do que em animais adultos (FERENS e HOVDE, 2011).

Segundo Ferens e Hovde (2011), em um estudo sobre a *E. coli* O157:H7, a presença da bactéria nos animais individualmente é de curta duração, mas a prevalência nos currais e na fazenda de isolados específicos pode se estender por meses ou anos, e alguns reservatórios designados como superhospedeiros, podem abrigar quantidades elevadas do patógeno no intestino por longos períodos. Por outro lado, os autores citaram também a possibilidade de a prevalência da bactéria

fora do intestino ser reduzida pela exposição ao sol e que a sobrevivência nas fezes de bovinos é fortemente influenciada pela dieta do animal, pois o feno oferecido na alimentação sofre metabolização e é convertido em ácidos fenólicos no rúmen, conhecidos por sua ação antimicrobiana.

Outra forma de prevenir ou controlar esses microrganismos na propriedade rural é o uso de probióticos na alimentação dos animais para reduzir a viabilidade da bactéria (FERENS e HOVDE, 2011), adotar medidas para controlar a contaminação da água utilizada na produção dos animais, como exposição ao sol, limpeza frequente e design dos recipientes (GRANT et al., 2011) e adição de cloro, realizar um controle microbiológico frequente no rebanho e prevenir-se quanto à inserção de animais provenientes de outras propriedades, como também de outras espécies que circulem no local de criação. Já a transmissão desses microrganismos por contato direto entre animais e humanos pode ser prevenida pelo simples hábito de lavar as mãos (FERENS e HOVDE, 2011).

A prevenção, redução e controle de *E. coli* patogênicas nas propriedades rurais são medidas importantes para evitar a contaminação da carne e concordando com Grant et al. (2011), podem ser alcançadas com a introdução de intervenções desenvolvidas na propriedade rural e no pré-abate, comumente empregadas para reduzir a incidência de *E. coli* O157.

## 5.2. Dendrograma

Para realizar o estudo epidemiológico a fim de definir a possível origem comum da *E. coli* O157:H7 isolada nos ambientes do matadouro-frigorífico, o método mais indicado devido ao alto potencial de discriminação entre os isolados é a Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE). Estudos comparando diferentes métodos apontaram a PFGE como o mais indicado, sendo eficaz para discriminar os subtipos dos isolados de *E. coli* O157 provenientes de surtos (HAHM et al., 2003; McLELLAN et al., 2003; GANDRA et al., 2008).

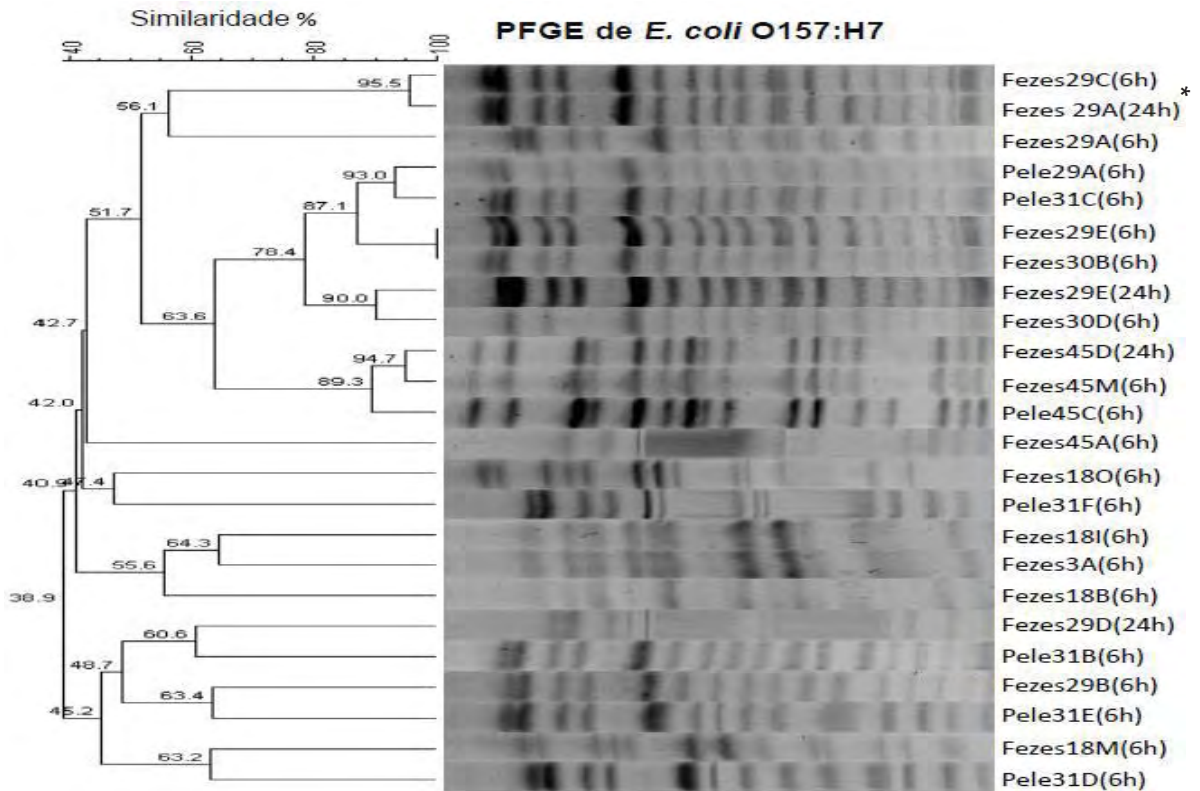
A técnica utilizada neste estudo tem um poder discriminatório relevante segundo Tenover et al. (1995) e Magalhães et al. (2005), pois, com ela, é possível obter um mínimo de dez fragmentos de DNA, ou seja, dez bandas no gel. Os

autores relataram que uma linhagem é considerada semelhante à outra quando ocorre um único evento genético com uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão das bandas.

Os isolados são considerados indistinguíveis, quando apresentam o mesmo número de bandas e as bandas correspondentes possuem aparentemente o mesmo tamanho. Os isolados considerados bem relacionados são aqueles que se diferenciam por um evento genético simples, como um ponto de mutação, ou inserção ou deleção de DNA, resultando em duas ou três bandas diferentes. Os isolados possivelmente relacionados se diferenciam por dois eventos genéticos independentes, resultando em cinco ou seis bandas diferentes e os isolados não relacionados são os que apresentam menos de 50% dos fragmentos em comum, ou seja, com sete ou mais bandas diferentes (TENOVER et al., 1995).

O dendrograma mostra a relação e o agrupamento dos isolados baseados em um único padrão de PFGE. Nas figuras 4 e 5, as barras indicam o grau de similaridade e as colunas indicam o tipo de amostra, o número do animal, a identificação do isolado e entre parênteses o tempo de incubação na fase de enriquecimento.

Nos dendrogramas visualizam-se os isolados e seus respectivos agrupamentos. Na Figura 4, referente às amostras de *E. coli* O157:H7, observam-se 22 agrupamentos e na figura 5, referente às amostras de *E. coli* O26, observam-se nove agrupamentos.

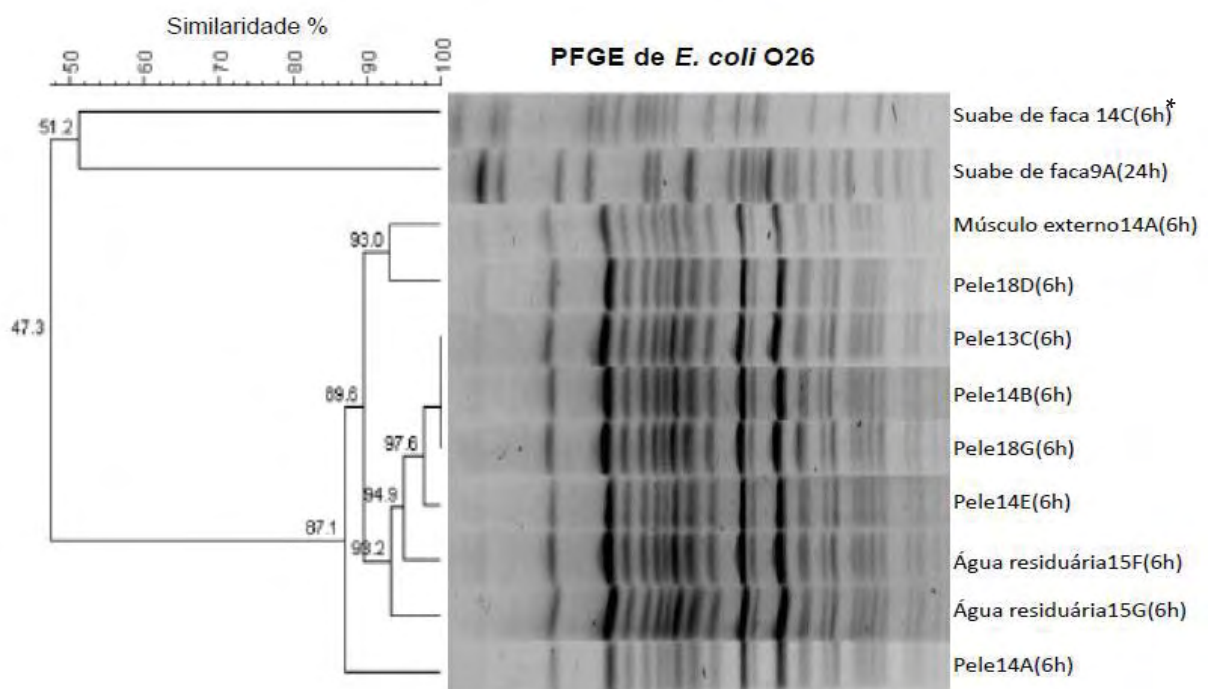


**Figura 4.** Análise da PFGE dos isolados de *E. coli* O157:H7 provenientes de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Entre os agrupamentos da *E. coli* O157:H7 verifica-se um clone, ou seja 100% de similaridade entre dois isolados provenientes das fezes dos animais números 29 e 30, provenientes da propriedade rural número 12; 95,5% de similaridade entre dois isolados provenientes de fezes do animal número 29, da propriedade rural número 12; 94,7% entre dois isolados de fezes do animal 45, proveniente da propriedade rural 16; 93,0% entre dois isolados da pele dos animais 29 e 30, provenientes da propriedade rural 12; 90,0% entre dois isolados das fezes dos animais 29 e 30, provenientes da propriedade rural 12; 89,3% entre três isolados de fezes e pele do animal 45, proveniente da propriedade rural 16; 87,1% entre quatro isolados de fezes dos animais 29 e 30 e da pele dos animais 29 e 31, provenientes da propriedade rural 12; 64,3% entre dois isolados de fezes dos animais 3 e 18, provenientes das propriedades rurais três e oito; 63,4% entre dois isolados de fezes do animal 29 e pele do animal 31, provenientes da propriedade rural 12; 63,2% entre dois isolados de fezes do animal 18 e pele do animal 31,

provenientes das propriedades rurais oito e 12; 60,6% entre dois isolados de fezes do animal 29 e pele do 31, provenientes da propriedade rural 12; e 47,4% entre dois isolados de fezes do animal 18 e pele do 31, provenientes das propriedades rurais oito e 12 (Figura 4). Nas Tabelas 5 e 12 são apresentadas informações acerca de tipo de amostra, número do animal e propriedade rural de origem.

Os dados obtidos neste estudo demonstraram também a ausência do gene *stx2* em um dos isolados dos agrupamentos, com 100%, 95,5%, 93,0%, 90,0%, 63,4% e 60,6% de similaridade, confirmando a perda deste gene nos isolados e a presença de *fepC* em um dos isolados, com 60,6% e 63,2% de similaridade.



\* Tipo de amostra, número do animal, letra de identificação do isolado e tempo de incubação entre parênteses.

**Figura 5.** Análise da PFGE dos isolados de *E. coli* O26 provenientes das amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Entre os agrupamentos da *E. coli* O26 também foi verificado um clone, ou seja, 100% de similaridade entre três isolados da pele dos animais números 13, 14 e 18, provenientes da propriedade rural número oito; 97,6% de similaridade entre quatro isolados provenientes da pele dos animais número 13, 14 e 18, da propriedade rural número oito; 94,9% entre cinco isolados da pele dos animais 13, 14 e 18 e da água residuária da carcaça do animal 15, provenientes da propriedade rural oito; 93,2% entre seis isolados da pele dos animais 13, 14 e 18 e da água

residuária da carcaça do animal 15, provenientes da propriedade rural oito; 93,0% de dois isolados do músculo externo da carcaça do animal 14 e da pele do animal 18, provenientes da propriedade rural oito; 89,6% entre oito isolados do músculo externo da carcaça do animal 14, da água residuária da carcaça do animal 15 e da pele dos animais 13, 14 e 18, provenientes da propriedade rural oito; 87,1% entre nove isolados do músculo externo da carcaça do animal 14, da água residuária da carcaça do animal 15 e da pele dos animais 13, 14 e 18, provenientes da propriedade rural oito; e 51,2% entre dois isolados dos suabes de facas números 9 e 14 (Figura 5). Nas Tabelas 5 e 4 são apresentadas informações acerca de tipo de amostra, número do animal e propriedade rural de origem.

Os isolados de *E. coli* O26 apresentaram um perfil de virulência homogêneo, diferenciando-se apenas pela presença do gene *stx1* em uma amostra de suabe de faca e do gene *fepC* em uma amostra de pele no agrupamento com 93,0% de similaridade, confirmando a predominância de EPEC O26 sorbitol-negativa.

Segundo a análise da PFGE, observa-se alta porcentagem de similaridade e um clone da *E. coli* O157:H7 entre as amostras de fezes e pele dos animais provenientes da mesma propriedade rural e 63,2% e 64,3% de similaridade entre as amostras de fezes e pele dos animais provenientes de propriedades rurais diferentes, mostrando que há transmissão da bactéria das fezes para a pele dos animais, seja por contato direto entre os animais na propriedade rural, durante o transporte até frigorífico, no confinamento dentro dele ou por contato entre as carcaças no abate, corroborando Elder et al. (2000) de que as fezes e a pele dos animais podem contribuir como fonte de contaminação da carcaça pela bactéria e com Arthur et al. (2007) de que o transporte e o confinamento no abatedouro podem aumentar a contaminação da pele dos animais.

A presença de clones de *E. coli* O26 na pele de três animais provenientes da mesma propriedade rural mostra que a transmissão delas ocorre da mesma forma que *E. coli* O157:H7. A similaridade entre os isolados provenientes de pele, músculo externo e água residuária da lavagem de carcaças antes de entrar na câmara fria demonstra que há transmissão da bactéria entre as etapas do fluxograma de abate, visto que houve transmissão da *E. coli* O26 entre amostras e sua presença em facas. Sendo assim, o fato de a *E. coli* O157:H7 não ter sido transmitida durante o



processamento da carcaça após a retirada da pele do animal não exclui a possibilidade de esse fato ocorrer.

Os achados deste estudo são similares aos descritos por Ferens e Hovde (2011), que em um estudo sobre a *E. coli* O157:H7 relataram que a presença de isolados com alta porcentagem de similaridade genética sugere que o ambiente pode ser veículo de transmissão do microrganismo.

Também observa-se que o período de manutenção na câmara fria pode ser eficaz como método de prevenção, uma vez que o sorotipo O26 presente no músculo externo foi transmitido para a água residuária da lavagem de carcaças, porém não esteve presente na carne no momento anterior à desossa, mas para confirmação desse fato são necessários outros estudos. Reforçando este estudo, Elder et al. (2000) verificaram uma diminuição na ocorrência de O157 entre carcaças evisceradas e meias carcaças após a utilização de estratégias de intervenção, como a refrigeração, verificando que os procedimentos sanitários são eficazes dentro do processo de abate.

Outra possibilidade é de que a lavagem das carcaças seja eficaz no controle e redução das bactérias, concordando com Cutter e Rivera-Betancourt (2000) que verificaram que a utilização de spray de água, água quente, 2% de ácido acético, 2% de ácido láctico ou 10% de fosfato trisódico foram eficazes como estratégias de intervenção para reduzir microrganismos de carcaças bovinas. A utilização apenas de água clorada para lavagem de carcaças no Brasil, parece ser um método eficiente de prevenção e controle de bactérias na carcaça, porém a realização de outros estudos incluindo outras substâncias químicas na água para lavar as carcaças é importante, visto que outros países utilizam outros produtos além do cloro.

Contrariando os achados deste trabalho, Thomas et al. (2012), ao utilizar a PFGE em um estudo longitudinal de *E. coli* em bovino, mostraram diferenças entre isolados de O157 colhidos da pele e da carcaça de um mesmo animal, indicando que a pele não foi a responsável pela contaminação da carcaça.

De acordo com os resultados apresentados nos dendrogramas, observa-se que existe o risco de a bactéria ser transmitida durante o processo de abate, chegar à carne e causar danos à saúde dos consumidores, visto que a *E. coli* O157:H7 e a

O26 são potencialmente patogênicas, segundo os sorotipos e os perfis de virulência, e que os fatores de virulência influenciam na sobrevivência das bactérias no ambiente extraintestinal (FERENS e HOVDE, 2011). Como no Brasil há mais consumo de carne bovina em relação à de outras espécies e também o hábito de comer carne mal cozida, o risco de infecção alimentar aumenta.

Para diminuir o risco de infecção pelo consumo de carne e para manter a indústria da carne competitiva, é essencial desenvolver, implementar ou melhorar o controle pré e pós-produção, com a finalidade de diminuir efetivamente o carregamento desses patógenos pelos bovinos e eliminar a contaminação dos produtos durante o processamento (HUSSEIN, 2007). Também é necessária a conscientização da população sobre o cozimento adequado dos alimentos (MATHUSA et al., 2010), com a finalidade de eliminar as bactérias patogênicas presentes no produto.

As principais medidas de controle e prevenção adotadas durante o fluxograma de abate são, a capacitação dos colaboradores do matadouro-frigorífico, o controle da capacidade e velocidade de abate e a higienização de ambientes e equipamentos, porém elas devem ser mais rigorosas a fim de evitar a má esterilização dos objetos utilizados na obtenção da carne, a má qualidade do serviço realizado pelos colaboradores devido à falta de tempo e também a formação de biofilme nos equipamentos da indústria, concordando com Ferens e Hodve (2011) que indicaram que a sobrevivência e a transmissão desses microrganismos podem ser auxiliadas pela formação de biofilme.

Devido ao fato das STEC não-O157 possuírem características fisiológicas semelhantes com a O157:H7, é provável que as mesmas medidas de prevenção e controle funcionem para ambos grupos de *E. coli* (GRANT et al., 2011), devendo ser aplicadas tanto nas propriedades rurais, quanto nos matadouros-frigoríficos.

### **5.3. Susceptibilidade a antimicrobianos**

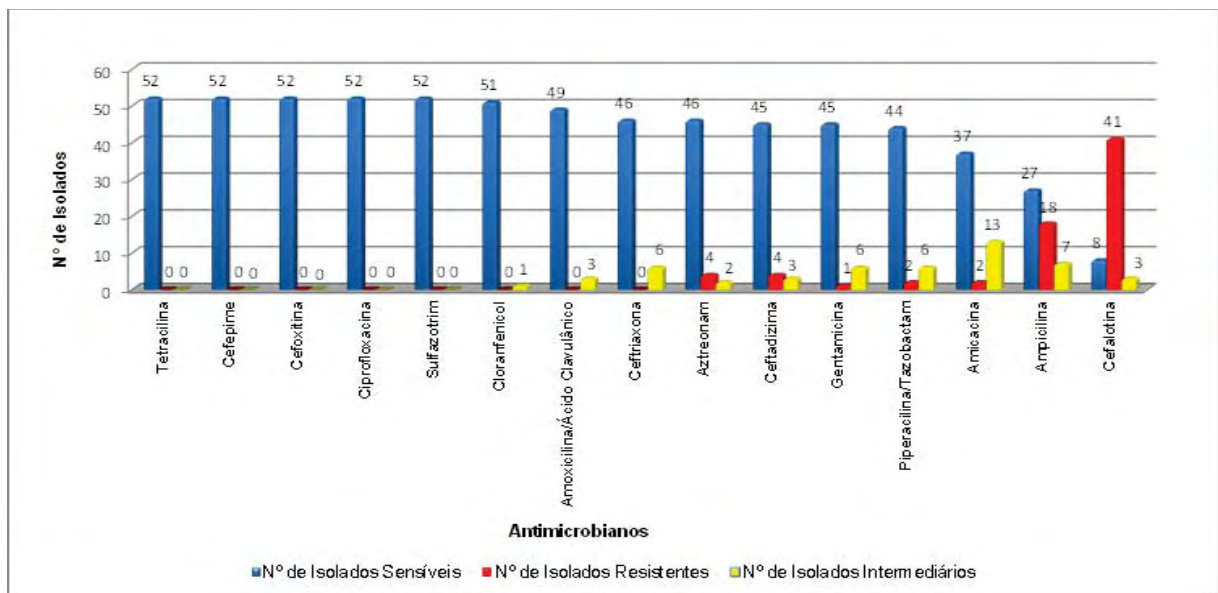
Nas Figuras 6 e 7 estão os padrões de resistência, sensibilidade e multirresistência dos isolados da *E. coli* O157:H7.



Somente as culturas típicas de *E. coli* O157:H7 foram submetidas aos testes de susceptibilidade frente à ação de antimicrobianos, pois a única cultura atípica não resistiu ao congelamento e à refrigeração. Na Figura 1 observa-se que 100% dos 52 isolados foram sensíveis a tetraciclina, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina e sulfazotrim, 98,08% (51) ao cloranfenicol, 94,23% (49) à amoxicilina/ácido clavulânico, 88,46% (46) à ceftriaxona e ao aztreonam, 86,54% (45) à ceftadizima e à gentamicina, 84,61% (44) à piperacilina/tazobactam, 71,15% (37) à amicacina, 51,92% (27) à ampicilina e 15,38% (8) à cefalotina.

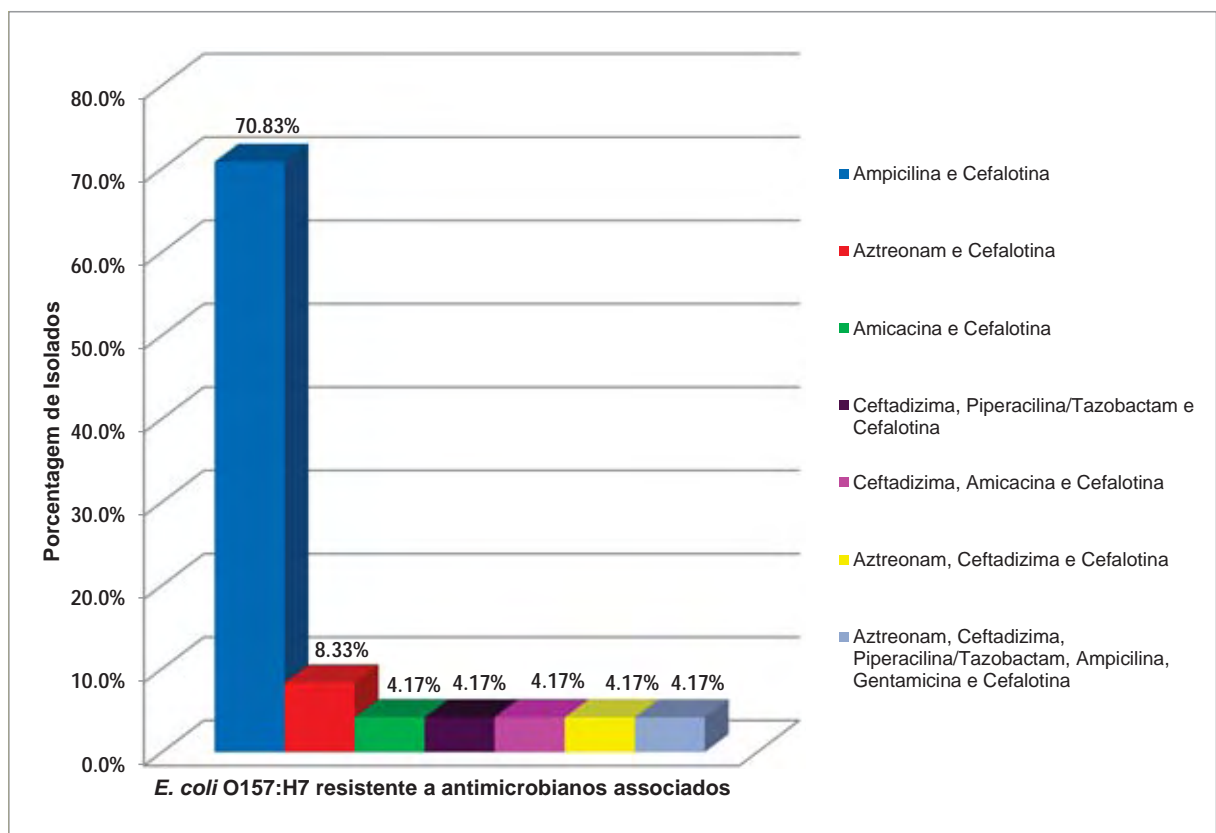
A resistência foi verificada em 78,85% (41) dos isolados para a cefalotina, 34,61% (18) para ampicilina, 7,70% (4) para aztreonam e ceftadizima, 3,84% (2) para amicacina e piperacilina/tazobactam e 1,92% (1) para gentamicina.

Ainda houve isolados com perfil intermediário, ou seja, aqueles cujas medidas dos halos variaram entre a medida estabelecida para a sensibilidade e para a resistência. Dos isolados, 25% (13) tiveram perfil intermediário para amicacina, 13,46% (7) para ampicilina, 11,54% (6) para piperacilina/tazobactam, gentamicina e ceftriaxona, 5,77% (3) para ceftadizima, cefalotina e amoxicilina/ácido clavulânico, 3,85% (2) para aztreonam e 1,92% (1) para cloranfenicol (Figura 6).



**Figura 6.** Perfil de resistência a antimicrobianos de *E. coli* O157:H7 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

A multirresistência a antimicrobianos foi verificada em 46,15% (24) dos isolados, sendo resistentes 38,46% (20) deles a dois, 5,77% (3) a três e 1,92% (1) a seis antimicrobianos. A distribuição entre as 24 culturas foi de 70,83% (17) para ampicilina e cefalotina, 8,33% (2) para aztreonam e cefalotina, 4,17% (1) para amicacina e cefalotina, assim como para ceftadizima, piperacilina/tazobactam e cefalotina, para ceftadizima, amicacina e cefalotina, para aztreonam, ceftadizima e cefalotina, e também para aztreonam, ceftadizima, piperacilina/tazobactam, ampicilina, gentamicina e cefalotina (Figura 7).



**Figura 7.** Perfil de multirresistência a antimicrobianos de *E. coli* O157:H7 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

Reforçando este estudo, Schroeder et al. (2002) também encontraram *E. coli* O157:H7 em bovinos sensíveis à cefoxitina, à ciprofloxacina e à ceftriaxona, porém, diferentemente deste estudo no que se refere à tetraciclina, frente à qual 100% dos isolados foram sensíveis. Os autores também relataram resistência à cefalotina e à ampicilina, porém com uma baixa porcentagem, de 1,0 % cada, e multirresistência a

dois, três e seis antibióticos, sugerindo que a pressão de seleção imposta pelo uso de antimicrobianos na terapêutica da medicina humana e veterinária ou na profilaxia no manejo dos animais de produção e manejo ambiental, seria um fator chave na seleção de STEC O157 e STEC não-O157 resistentes a antimicrobianos.

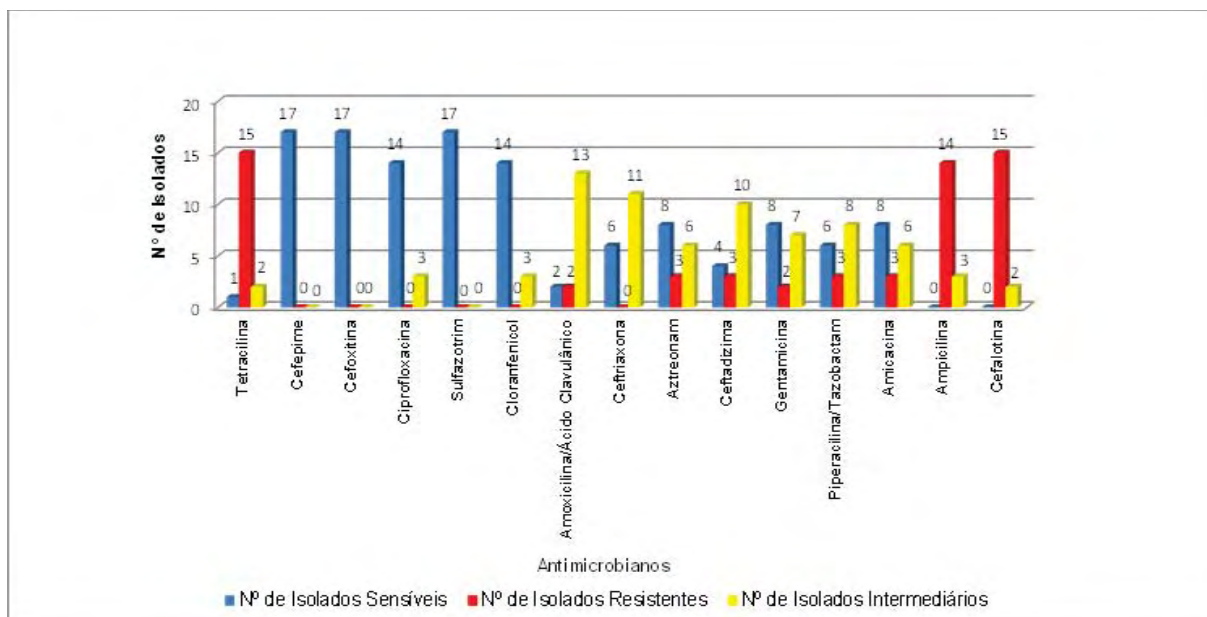
Baixa porcentagem de resistência à ampicilina (5,4%) e à gentamicina (0,4%), e maior multirresistência (75,0%) a dois, três, quatro, seis e oito antimicrobianos também foi encontrada em *E. coli* isoladas de gado de corte no Japão (SASAKI et al., 2012).

Contrariando este estudo, Kappeli et al. (2011) verificaram 4,5% dos isolados de STEC O157 provenientes de casos clínicos na Suíça resistentes à tetraciclina. Porém, encontraram 100% de sensibilidade dos isolados a ciprofloxacina, cefepime e ceftazidima.

Nas Figuras 8 e 9 estão os padrões de resistência, sensibilidade e multirresistência dos isolados de *E. coli* O26. Todos os isolados mostraram-se sensíveis a ceftazidima, cefepime e sulfazotrim; 82,35% (14) delas a ciprofloxacina e cloranfenicol, 47,06% (8) a aztreonam, ampicilina e gentamicina, 35,29% (6) a piperacilina/tazobactam e ceftioxona, 23,53% (4) a ceftadizima, 11,76% (2) a amoxicilina/ácido clavulânico e 5,88% (1) a tetraciclina.

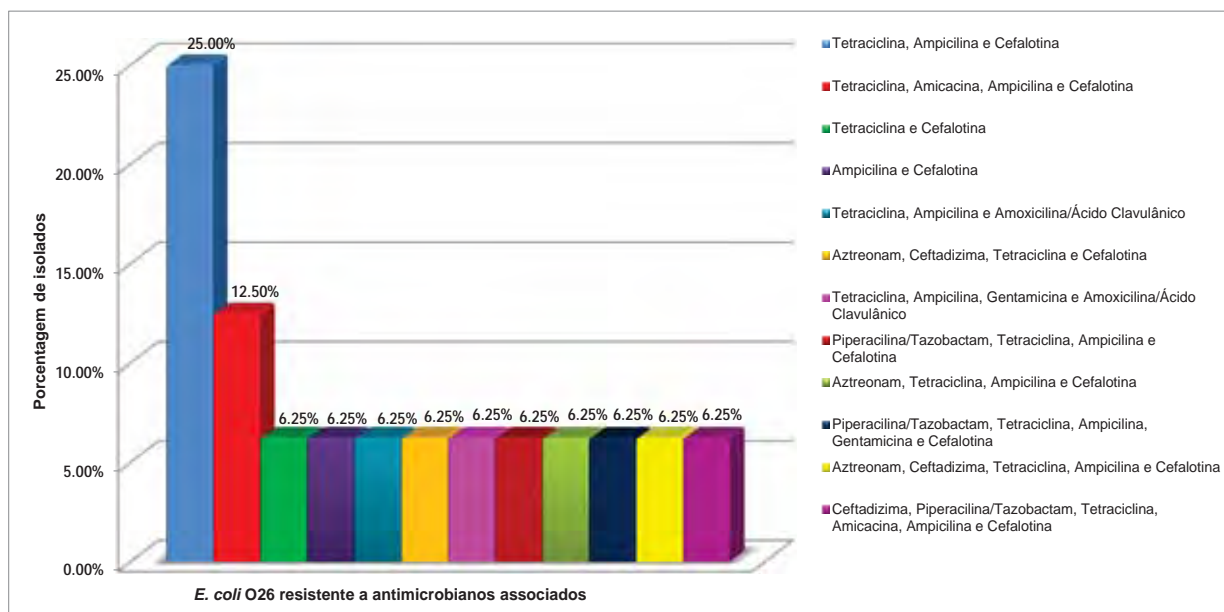
A resistência foi verificada em 88,23% (15) dos isolados para tetraciclina e cefalotina, 82,35% (14) a ampicilina, 17,65% (3) a aztreonam, ceftadizima, piperacilina/tazobactam e ampicilina, e 11,76% (2) a gentamicina e amoxicilina/ácido clavulânico.

As porcentagens de isolados com perfil intermediário foram de 76,47% (13) para amoxicilina/ácido clavulânico, 64,70% (11) para ceftioxona, 58,82% (10) para ceftadizima, 47,06% (8) para piperacilina/tazobactam, 41,18% (7) para gentamicina, 35,29% (6) para aztreonam e ampicilina, 17,65% (3) para cloranfenicol, ampicilina e ciprofloxacina, 11,76% (2) para cefalotina e 5,88% (1) para tetraciclina (Figura 8).



**Figura 8.** Perfil de resistência a antimicrobianos de *E. coli* O26 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

A multirresistência aos antimicrobianos foi observada em 94,12% (16) das culturas, sendo resistentes 11,76% (2) a dois princípios ativos, 29,41% (5) a três, 35,29% (6) a quatro, 11,76% (2) a cinco e 5,88% (1) a seis antibióticos. A distribuição entre as 16 culturas foi de 25% (4) para tetraciclina, ampicilina e cefalotina, 12,5% (2) para tetraciclina, amicacina, ampicilina e cefalotina, e 6,25% (1) para tetraciclina e cefalotina, 6,25% (1) para ampicilina e cefalotina, 6,25% (1) para tetraciclina, ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico, 6,25% (1) para aztreonam, ceftadizima, tetraciclina e cefalotina, 6,25% (1) para tetraciclina, ampicilina, gentamicina e amoxicilina/ácido clavulânico, 6,25% (1) para piperacilina/tazobactam, tetraciclina, ampicilina e cefalotina, 6,25% (1) para aztreonam, tetraciclina, ampicilina e cefalotina, 6,25% (1) para piperacilina/tazobactam, tetraciclina, ampicilina, gentamicina e cefalotina, 6,25% (1) para aztreonam, ceftadizima, tetraciclina, ampicilina e cefalotina, 6,25% (1) para ceftadizima, piperacilina/tazobactam, tetraciclina, amicacina, ampicilina e cefalotina (Figura 9).



**Figura 9.** Perfil de multirresistência a antimicrobianos de *E. coli* O26 isoladas de amostras colhidas no fluxograma de abate bovino, estado de São Paulo, 2011.

A única cultura pertencente ao sorotipo O113 mostrou-se sensível à maioria dos antimicrobianos testados, exceto a ampicilina e cefalotina, às quais foi resistente.

Mora et al. (2005) analisando a resistência antimicrobiana de cepas de STEC O157:H7 e não-O157 isoladas de humanos, bovinos, ovelhas e alimentos na Espanha, verificaram que 41% dos isolados foram resistentes a pelo menos um dos 26 antimicrobianos testados. Comparando os resultados dos autores com os deste estudo, verificou-se uma porcentagem menor de multirresistência entre as STEC O157:H7 (98% contra 46,15%) e diferenças no perfil de multirresistência mais frequentemente encontrado (sulfisoxazole, tetraciclina e estreptomicina contra ampicilina e cefalotina). Entre as não-O157 verificou-se uma porcentagem de cepas multirresistentes maior que a dos autores citados (94,12% contra 92%) e perfis de multirresistência diferentes (tetraciclina, ampicilina e cefalotina contra sulfisoxazole, tetraciclina e estreptomicina).

Sasaki et al. (2012), estudando a resistência a antimicrobianos em STEC O157 e O26 isoladas de gado de corte no Japão, relataram 36,4% dos isolados de *E. coli* O26 resistentes à ampicilina, nenhuma à gentamicina e 18,2% delas ao cloranfenicol, diferentemente deste estudo, que encontrou porcentagens maiores, de

82,35% e 11,76% para ampicilina e gentamicina, respectivamente, e nenhum isolado resistente ao cloranfenicol. Os autores verificaram multirresistência a dois, três, sete e oito antimicrobianos em 100% dos isolados, porcentagem semelhante à deste estudo que foi de 94,12%.

Buven et al. (2012), em um estudo sobre a resistência de STEC O157:H7/H<sup>-</sup> e O26 em casos de infecção em humanos na Bélgica, encontraram para a O157:H7/H<sup>-</sup> 32,4% de resistência a tetraciclina, 23,5% a ampicilina e 2,9% a cloranfenicol, porcentagens maiores a tetraciclina e cloranfenicol, e menor a ampicilina em relação a este estudo. Ao contrário dos achados deste estudo os autores verificaram ausência de resistência a piperacilina/tazobactam, ceftadizima, aztreonam, amicacina e gentamicina.

Buven et al. (2012) ainda relataram porcentagens de resistência menores de *E. coli* não-O157 em relação a ampicilina (27,1%), tetraciclina (26,2%), amoxicilina/ácido clavulânico (2,8%), piperacilina/tazobactam (1,9%), ceftadizima (1,9%), gentamicina (1,9%) e aztreonam (0,9%) quando comparadas a *E. coli* O26 encontrada neste trabalho, que apresentou resistência, respectivamente, de 82,3%, 88,23%, 11,76%, 17,65%, 17,65%, 11,76% e 17,65%. Os autores relataram também a ausência de isolados resistentes a ceftriaxona, cefepime, ciprofloxacina e amicacina, corroborando este estudo, exceto para a amicacina, cuja resistência foi de 17,65%. A resistência de 7,5% dos isolados ao cloranfenicol também foi descrita, ao contrário dos resultados deste trabalho, cuja maioria (82,35%) dos isolados for sensível.

Assim como relataram Mora et al. (2005), este estudo também encontrou o gene *eae* na maioria das cepas de O26 e O157:H7 resistentes a antimicrobianos, porém a associação entre resistência e a presença do gene *eae* relatada pelos autores não foi confirmada de forma plena neste estudo.

Confirmando este estudo, Vaz et al. (2004) verificaram 51,7% de STEC isoladas de pacientes no Brasil resistentes a pelo menos um antimicrobiano.

A resistência a múltiplos antimicrobianos em STEC pode resultar da distribuição de elementos genéticos, como plasmídeos, transposons e íntegrans, que conferem resistência a várias antibióticos, porém outros estudos são



necessários para definir os mecanismos e diminuir o desenvolvimento da resistência (MORA et al., 2005).

O uso de antimicrobianos como agentes promotores de crescimento em animais de produção também já foi incriminado por modificar a microbiota intestinal dos animais pela criação de uma pressão de seleção, favorecendo o desenvolvimento de cepas resistentes a antimicrobianos (DIARRA et al., 2009).

A multirresistência a antimicrobianos pode ser resultado da passagem horizontal de genes por mecanismos de transferência adotados pela bactéria (SCHROEDER et al., 2002) e se tornar um problema de saúde pública se os humanos se infectarem devido à ingestão de carne contaminada, já que isolados resistentes a antimicrobianos presentes nos animais de produção, podem entrar no fluxograma de produção do alimento e serem encontrados nos produtos de origem animal presentes nos mercados (DIARRA et al., 2009).

Apesar de a grande parte dos isolados deste estudo serem susceptíveis à maioria dos antimicrobianos testados, eles devem ser usados com critério, para evitar a multirresistência em tratamentos futuros, visto que muitos antibióticos são usados tanto na medicina veterinária quanto na humana, e os consumidores deveriam exigir a redução ou eliminação do uso de antimicrobianos para fins não terapêuticos nos animais de produção.

Portanto, assim como Thomas et al. (2012), verificou-se que a *E. coli* O157:H7 foi a mais prevalente no abatedouro, porém as não-O157, como a O26 e O113, que são clinicamente significantes e potencialmente patogênicas, estão começando a emergir no processo de abate bovino no país. Com isso, em concordância com Vaz et al. (2004), nota-se que é ainda mais importante a implementação de um sistema de vigilância para pessoas com diarreia sanguinolenta e SHU no Brasil, a fim de contribuir com a estimativa real da associação de cepas de *E. coli* O157:H7 e não-O157 com infecções humanas.

Diante do exposto e tendo em vista que a dose infectante de *E. coli* O157 é baixa e a capacidade de causar doença severa é alta (COIA, 1998), é importante que as medidas de prevenção da *E. coli* O157:H7 dentro do matadouro-frigorífico sejam revistas e que incluam as *E. coli* não-O157 nos programas de controle de qualidade, uma vez que estudos sugerem que medidas de controle para *E. coli*

O157 podem ser eficazes para as não-O157 (MATHUSA et al., 2010), a fim de evitar que as bactérias cheguem à carne e prejudiquem a saúde do consumidor.

Sendo assim, as medidas de higiene implementadas nos pontos críticos do processo de abate devem ser mais eficazes quanto à redução da contaminação por esses microrganismos. Contudo, verifica-se também que o controle de animais portadores dessas bactérias dentro da propriedade rural também torna-se importante neste ciclo, uma vez que evita a disseminação delas no rebanho e também sua chegada ao matadouro-frigorífico por meio das fezes.

Em concordância com Hussein (2007), também é importante que as autoridades de saúde pública realizem estratégias atuais e futuras de prevenção, incluindo programas educacionais para conscientizar produtores rurais, produtores de carne, manipuladores e consumidores, sobre o problema causado por *E. coli* patogênicas.



## 6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, é possível concluir que:

- Há a ocorrência de *E.coli* O157:H7 em matadouro-frigorífico bovino, sendo as fezes e a pele dos animais os pontos de disseminação da bactéria no processo de abate, apontados como possíveis fontes de contaminação da carne.
- A confirmação sorológica revelou a presença do sorotipo O157:H7 e também de outros pertencentes a *E. coli* não-O157, entre eles o O26 e O113, considerados patógenos emergentes.
- A presença, principalmente dos genes *eae* e *stx2* na *E. coli* O157:H7, *eae* e *stx1* na *E. coli* O26 e *stx1* e *stx2* na *E. coli* O113, mostra que as bactérias possuem um perfil de virulência relevante, pois esses genes são responsáveis por patologias severas.
- Os resultados mostram que a origem comum de *E.coli* O157:H7 em matadouro-frigorífico é as fezes dos bovinos e de *E. coli* O26 é a pele contaminada pelas fezes, apontando que há a transmissão das bactérias entre os animais e entre as etapas do fluxograma do abate.
- Os isolados de *E.coli* O157:H7 e de *E. coli* O26 apresentaram multirresistência a até seis antimicrobianos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de *E.coli* patogênicas no matadouro-frigorífico e sua transmissão entre as etapas do abate indicam a necessidade da revisão ou da implementação de medidas de prevenção mais eficazes, a fim de impedir que as bactérias cheguem à carne e possam ser um risco potencial a saúde do consumidor e, conseqüentemente, tornar a indústria mais competitiva devido a uma maior segurança alimentar dos produtos produzidos.

As principais medidas de prevenção e controle desses microrganismos na indústria estão relacionadas com a capacitação do colaborador, pois ele é o responsável pela manipulação do produto durante as etapas do processamento, e também pela higienização de ambientes, de equipamentos e objetos que entram em contato com o alimento produzido, e dos caminhões de transporte dos animais.

Atividades consideradas simples, como a lavagem das mãos e a higiene pessoal do colaborador, a esterilização de ganchos e facas, a correta higienização do ambiente, dos equipamentos e superfícies da indústria, e dos caminhões de transportes dos animais, são fundamentais para impedir que as *Escherichia coli* patogênicas presentes nas fezes sejam transmitidas durante as etapas do abate bovino, formem biofilme nos equipamentos da indústria e sejam transportadas entre as propriedades rurais e entre as propriedades rurais e o matadouro-frigorífico.

Além do colaborador, notou-se que o resfriamento das carcaças pode ser um ponto relevante no fluxograma de abate, no controle ou impedimento da veiculação de microrganismos presentes na carcaça para a carne, ou a utilização de outros produtos químicos além do cloro como sanitizantes na lavagem das carcaças, contudo esses fatores devem ser avaliados em estudos posteriores.

Também é extremamente importante a prevenção e a diminuição da disseminação das bactérias nas propriedades rurais, para evitar sua chegada ao matadouro-frigorífico. Para isso dietas devem ser preparadas para auxiliar na diminuição da excreção dos microrganismos nas fezes de animais portadores, como por exemplo, a utilização de probióticos ou a inclusão de feno na alimentação, proporcionando atividade antimicrobiana no rúmen dos animais. Outra possibilidade

seria o tratamento dos resíduos dos animais e também a realização do controle microbiológico frequente do rebanho.

A adoção de programas educacionais também é fundamental para conscientizar produtores rurais, manipuladores e consumidores de carne sobre o risco à saúde que esses microrganismos patogênicos podem causar, tornando-se um problema de saúde pública.

## 8. REFERÊNCIAS \*

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

AN, H.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAUTELS, C.; HAREL, J. Distribution of a novel locus called paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Heidelberg, v. 473, p. 179-184, 1999.

ANDREOLI, S. P.; TRACHTMAN, H. A.; ACHESON, D. W.; SIEGLER, R. L.; OGRID, T. G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. **Pediatric Nephrology**, Berlim, v. 17, n. 4, p. 293-298, 2002.

ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS JR., J. G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 29-51, 1996.

ARTHUR, T.M.; BARKOCY-GALLAGHER; RIVERA-BETANCOURT, M.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, 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 carcass of beef cattle at processing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.70, n. 2, p. 280-286, 2007.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M. M.; SHERRIS, J.G.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

---

\* ABNT NBR-6023/2002

BEAUDRY, M.; ZHU, C.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 1, p. 144-148, 1996.

BEKAL, S.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; PREFONTAINE, G.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 2113-2125, 2003.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina de shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.

BETTELHEIM, K. A. The sources of "OH" serotypes of *Escherichia coli*. **The Journal of Hygiene**, v. 80, n.1, p. 83-113, 1978.

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Human infections with shiga-toxin producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 4, p. 635-639, 1998.

BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; TARR, P. I. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 8, p. 4225-4228, 2005.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M. P.; GONZALEZ, E. A.; BERNARDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types Shiga-toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae $\xi$ ). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 645-651, 2004.

BOERLIN, P.; McEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R.P.; GYLES, C.L. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999.

BORGES, J. T. S.; FREITAS, A. S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim de Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 1-18, 2002.

BOYSE, J., THOMSON-CARTER, F., CARTER, P.; BOOTH, I. R. Acid tolerance in VTEC. **Supplement to SCIEH Weekly Report**, v. 97, n. 13, p. 19-20, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 5 de 8 de novembro de 1988. Aprova a padronização de cortes de carne bovina. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1. pt. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952: alterado pelos Decretos nº 1255 de 25 junho de 1962, nº 1236 de 02 setembro de 1994, nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996, nº 2244 de 04 junho de 1997. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 1997. 241 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária – SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Coordenação Geral de Programas Especiais – CGPE. Circular Nº 175/2005/CGPE/DIPOA, de 16 de maio de 2005. **Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole**. Brasília: Ministério da Agricultura, 39 p, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, v. 5, n. 6, 2005b. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano05\\_n06\\_ve\\_dta\\_brasil.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano05_n06_ve_dta_brasil.pdf)>. Acesso em: 24 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados Epidemiológicos – DTA, período de 2000 a 2011**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_dta\\_periodo\\_2000\\_2011\\_site.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf)>. Acesso em: 24 fev. 2013.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology**, New York, v. 142, n. 11, p. 3305-3315, 1996.

BUVENS, G.; GHELDRE, Y.; DEDISTE, A.; MOREAU, A.; MASCART, G.; SIMON, A.; SCHEUTZ, D. F.; LAUWERS, S.; PIÉRARD, D. Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in the Brussels – capital region Belgium in 2008-2010. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4., p. 1336-1345, 2012.

CAMGUILHEM, R.; MILON, A. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 4, p. 743-747, 1989.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

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

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**, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p. 111-121, 1999.

CHASE-TOPPING, M. E.; ROSSER, T.; ALLISON, L. J.; COURCIER, M.; EVANS, J.; McKENDRICK, I. J.; PEARCE, M. C.; HANDEL, I.; CAPRIOLI, A.; KARCH, H.; HANSON, M. F.; POLLOCK, K. G. J.; LOCKING, M. E.; WOOLHOUSE, M. E. J.; MATTHEWS, L.; LOW, J. C.; GALLY, D. L. Pathogenic potential to humans of bovine *Escherichia coli* O26, Scotland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 439-448, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Outbreaks of *E. coli* O157:H7 associated with petting zoos, North Carolina, Florida and Arizona. 2005.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5450a1.htm>>. Acesso em: 24 fev. 2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 2008.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm>>. Acesso em: 24 fev. 2013.

CDCc. Centers for Disease Control and Prevention. **CDC 2011: Estimates: findings.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html#death>>. Acesso em: 24 fev. 2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate Foodborne Outbreak Investigations.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html>>. Acesso em: 24 fev. 2013.

COIA, J. E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Hoboken, v. 20, n. 1, p. 1-9, 1998.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento da Comissão (471/2001/CE) de 8 de junho de 2001. **Jornal Oficial da União Européia**, L165, p. 48-53, 2001.



CONSTANTINIU, S. *Escherichia coli* enterohemorrhagic – an emerged pathogen of human infections. Part II. Non-O157 *Escherichia coli* enterohemorrhagic. **The Journal of Preventive Medicine**, v. 10, n. 4, p. 57-73, 2002.

CUTTER, C.N.; RIVERA-BETANCOURT, M. Interventions for the reduction of Salmonella Typhimurium DT104 and non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 10, p. 1326-1332, 2000.

DAIGLE, F.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M.; LEBEL, P. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa- encoded fimbrial adhesion systems among uropathogenic *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 286-291, 1994.

DIARRA, M. S.; GIGUÈRE, K.; MALOUIN, F.; LEFEBVRE, B.; BACH, S.; DELAQUIS, P.; ASLAM, M.; ZIEBELL, K. A.; ROY, G. Genotype, serotype, and antibiotic resistance of sorbitol-negative *Escherichia coli* isolates from feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 28-36, 2009.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 855–856, 1984.

DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. cap. 10, p. 171-191.

DOZOIS, C. M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; CURTIS III, R. Relationship between the *Tsh* Autotransporter and Pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and Localization and Analysis of the *tsh* Genetic Region. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 7, p. 4145-4154, 2000.

DURSO, L. M.; BONO, J. L.; KEEN, J. E. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4941-4944, 2005.

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 carcass of beef cattle during processing. **Applied Biological Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2999-3003, 2000.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEBLING, S.; ALT, K.; ANTA, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BO, U.; STEINRUCK, H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing

*Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FAGAN, P. K.; HORNITZKY, M. A.; BETTELHEIM, K. A.; DJORDJEVIC, S. P. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 868-872, 1999.

FANG, T. J.; WEI, Q.; LIAO, C.; HUNG, M.; WANG, T. Microbiological quality of 18° C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 241-250, 2003.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nation. **FAOSTAT**. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> >. Acesso em 24 fev. 2013.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nation. **FAOSTAT**, 29 jun. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor>>. Acesso em 24 fev. 2013.

FDA. Food and Drug Administration. ***Escherichia coli* O157:H7 foodborne illness and the usefulness of the critical path in FDA's work to combat it**, v. XXIII, n. 1, jan./fev. 2008. Disponível em: <[www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm083980.htm](http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm083980.htm)>. Acesso em: 24 fev. 2013.

FENG, P.; DEY, M.; ABE, A.; TAKEDA, T. Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both shiga toxin 1 and 2 genes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 711-717, 2001.

FERENS, W.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 8, n.4, p. 465-487, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 182.

FRATAMICO, P. M.; DEBROY, C.; STROBAUGH JR., T. P.; CHEN, C. DNA sequence of the *Escherichia coli* O103 O antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O103 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 515-522, 2005.

FRATAMICO, P. M.; DEBROY, C.; MIYAMOTO, T.; LIU, Y. PCR Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in Food by Targeting Genes in the *E. coli* O145 O-Antigen Gene Cluster and the Shiga Toxin 1 and Shiga Toxin 2 Genes. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 6, n. 5, p. 605-611, 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 Infectious Diseases**, Cary, v. 185, n. 1, p. 74-84, 2002.

FULLER, C. A.; PELLINO, C.A.; FLAGLER, M. J.; STRASSER, J. E.; WEISSI, A. A. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n. 3, p. 1329-1337, 2011.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; LUTHY, J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 10, n. 1, p. 31-34, 1990.

GANNON, V. P. G.; D´SOUZA, S.; GRAHAM, T.; KING, R. K. ; RAHN, K. READ, S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 3, p. 656-662, 1997.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; DE MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Science and Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GRANT, M. A.; HEDBERG, C.; JOHNSON, R.; HARRIS, J.; LOGUE, C. M.; MENG, J.; SOFOS, J. N.; DICKSON, J. S. The significance of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. **Food Protection Trends**, Executive summary, p. 33-45, 2011.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiological Review**, Oxford, v. 13, p. 60-98, 1991.

HAHM, B.; MALDONADO, Y.; SCHREIBER, E.; BHUNIA, A. K.; NAKATSU, C. H. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 387-399, 2003.

HANCOCK, D. D.; RICE, D. H.; THOMAS, L. A.; DARGATZ, D. A.; BESSER, T. E. Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 5, p. 462-465, 1997.

HERRERO, M.; LORENZO, V.; NEILANDS, J. B. Nucleotide Sequence of the iucD Gene of the pColV-K30 Aerobactin Operon and Topology of Its Product Studied with phoA and lacZ Gene Fusions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 1, p. 56-64, 1988.

HORNITZKY, M.A.; MERDIECA, K.; BETTELHEIM, K.A.; DJORDJEVIC, S.P. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3405-3412, 2005.

HUSSEIN, H.S. Prevalence and pathogenicity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 13, E. Suppl.: E63-E72, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Razão entre população humana e efetivo de bovinos – Brasil – 1940/2010**. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PPM01&sv=59&t=efetivo-dos-rebanhos-por-tipo-de-rebanho>>. Acesso em: 24 fev. 2013.

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**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 29-36, 2005.

JENKINS, C.; EVANS, J.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; FRANKEL, G. *Escherichia coli* serogroup O26 – a new look at an old adversary. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, n. 104, n. 1, p. 14-25, 2008.

JOHNSON, R. P.; CLARKE, R. C.; WILSON, J. B.; READ, S. C.; RAHN, K.; RENWICK, S. A.; SANDHU, K. A.; ALVES, D.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; McEWEN, S. A.; SPIKA, J. S.; GYLES, C. L. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 10, p. 1112-1122, 1996.

JORIS, M. A.; PIERARD, D.; ZUTTER, L. D. Occurrence and virulence patterns of *E. coli* O26, O103, O111 and O145 in slaughter cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 418-421, 2011.

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

KAPPELI, U.; HACHLER, H.; GIEZENDANNER, N.; CHEASTY, T.; STEPHAN, R. Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 associated with human infections in Switzerland, 2000-2009. **Epidemiology and Infection**, New York, v.139, n. 7, p. 1097-1104, 2011.

KARCH, H.; MEYER, T.; RUSSMANN, H.; HEESEMANN, J. Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. **Infection and Immunity**, v.60, n.8, p. 3464-3467, 1992.

KIM, JI-YEON; KIM, SO-HYUN; KWON, NAM-HOON; BAE, WON-KI; LIM, JI-YOUN; KOO, HYE-CHEONG; KIM, JUN-MAN; NOH, KYOUNG-MIN; JUNG, WOO-KYUNG; PARK, KUN-TAEK; PARK, YONG-HO. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 6, n. 1, p. 7-19, 2005.

LORTIE, L. A.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* Strains Producing Heat-Stable Enterotoxin b (STb) Isolated from Humans with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 656-659, 1991.

LOW, J. C.; MCKENDRICK, I. J.; McKECHNIE, C.; FENLON, D.; NAYLOR, S. W.; CURRIE, C.; SMITH, D. G. E.; ALLISON, L.; GALLY, D. L. Rectal carriage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.1, p.93-97,2005.

LUCK, S. N.; BENNETT-WOOD, V.; POON, R.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 5, p. 3063-3071, 2005.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 98, n. 6, p. 1332-1344, 2005.

MANNA, S. K.; MANNA, C.; BATABYAL, K.; DAS, B.; GOLDR, D.; CHATTOPADHYAY, S.; BISWAS, B. K. Serogroup distribution and virulence characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* from food and cattle stool. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 108, n. 2, p. 658-665, 2010.

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

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J.J.; THOMSON-CARTER, F. M.; GARVEY, P.; MCGUIRE, L.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 256-266, 2003.

McLELLAN, S. L.; DANIELS, A. D.; SALMORE, A. K. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2587-2594, 2003.

MENG, J.; DOYLE, M .P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P. & BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2007. cap. 12, p. 249-269.

MONAGHAN, A.; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; McDOWELL, D.; BOLTON, D.J. Serotypes and virulence profiles of non-O157 shigatoxin producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 24, p. 8662-8668, 2011.

MONDAY, S. R.; BEISAW, A.; FENG, P. C. H. Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 21, n. 4, p. 308-311, 2007.

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 *Escherihcia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 7, p. 793-806, 2005.

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

NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 35, n. 2, p. 275-288, 2000.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPELYARD, G. A.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER, J. M. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of



isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousands Oaks, v. 15, p. 242-252, 2003.

OMISAKIN, F.; MACRAE, M.; OGDEN, I. D.; STRACHAN, J. C. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2444-2447, 2003.

O'REILLY, K. M.; LOW, J. C.; DENWOOD, M. J.; GALLY, D. L.; EVANS, J.; GUNN, G. J.; MELLOR, D. J.; REID, S. W. J.; MATTHEWS, L. Associations between the presence of virulence determinants and the epidemiology and ecology of zoonotic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 24, 2010.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Serotyping of *E. coli*. In: BERMAN, T. **Methods in microbiology**. London: Academic Press, 1984. vol. 14, p. 43-112.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. **J. Hyg.**, v. 95, p. 551-575, 1985.

OSEK J.; WEINER, M.; HARTLAND, E. L. Prevalence of the IpfO113 gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 259-266, 2003.

PADDOCK, Z.; SHI, X.; BAI, J.; NAGARAJA, T. G. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 3-4, p. 381-388, 2012.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb o111 and rfbO157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998a.

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

PATON, A. W.; WOODROW, M. C.; DOYLE, R.; LANSER, J. A.; PATON, J. C. Molecular characterization of a shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, 3357-3361, 1999.



PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxa and saa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.1, p.271-274, 2002.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. Detection by 5'-nuclease PCR of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.185-192, 2004.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G., F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E. J.; DAVIS, W.; LIMK, A.; DIMALANTAK, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCHI, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, London, v. 409, p. 529-533, 2001.

PIZZOLITTO, N. **Caracteres epidemiológicos de surtos de doenças diarreicas agudas ocorridas em núcleos receptores turísticos do estado de São Paulo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos e Nutrição), São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Disponível em: <[http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/AlimentoseNutricao/nadia\\_pizolitto-completo.pdf](http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/AlimentoseNutricao/nadia_pizolitto-completo.pdf)>. Acesso em: 24 fev. 2013.

PULSENET USA. The National molecular subtyping network for foodborne disease surveillance. **One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei*, and *Shigella flexneri* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**. Sections 5.1, 5.2, 5.4. p1-16. 2009. Disponível em: <[www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/5%201\\_5%202\\_5%204\\_PNetStand\\_Ecoli\\_with\\_Sflexneri.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/5%201_5%202_5%204_PNetStand_Ecoli_with_Sflexneri.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2012.

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

RICE, E. W.; ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C. Efficacy of beta-glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p.1203-1205, 1990.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia*

*coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

SAS Institute. 2005. User's guide: Statistics. Cary.

SASAKI, Y.; TSUJIYAMA, Y.; KUSUKAWA, M.; MURAKAMI, M.; KATAYAMA, S.; YAMADA, Y. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 140-145, 2011.

SASAKI, Y.; USUI, M.; MURAKAMI, M.; HARUNA, M.; KOJIMA, A.; ASAI, T.; YAMADA, Y. Antimicrobial resistance in shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Shinjuku-ku, v. 65, n. 2, p. 117-121, 2012.

SCHMIDT, H.; KARCH, H.; BEUTIN, L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin family. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 117, n. 2, p. 189-196, 1994.

SCHMIDT, G.; SEHR, P.; WILM, M.; SELZER, J.; MANN, M.; AKTORIES, K. Gln 63 Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. **Nature**, London, v. 387, p. 725-729, 1997.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J. S.; HUPPERTZ, H. I.; FROSCH, M.; KARCH, H. *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 11, p. 3491-3496, 1999.

SCHOEDER, C. M.; ZHAO, C.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D. D.; McDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; MENG, J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine and food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 2, p. 576-581, 2002.

SEHGAL, R.; KUMAR, Y.; KUMAR, S. Prevalence and geographical distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in India: 10-year survey. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 4, p. 380-383, 2008.

SHAH, D. H.; SHRINGI, S.; BESSER, T. E.; CALL, D. R. *Escherichia*. In: LIU, D. **Molecular detection of foodborne pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 27, p. 369-389.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7. In: \_\_\_\_\_. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. p. 149-154.

STEVENS, M. P.; VAN DIEMEN, P. M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; WALLIS, T.S. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxinproducing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5158- 5166, 2002 .

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÉRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence of bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesions of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 10, p. 653-658, 2002.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

THOMAS, K. M.; McCAM, M. S.; COLLERY, M. M.; LOGAN, A.; WHYTE, P.; McDOWELL, D. A.; DUFFY, G. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 288-296, 2012.

TOMA, C.; ESPINOSA, E. M.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4937-4946, 2004.

TOMPKIN, R. B.; McNAMARA, A. M.; ACUFF, G. R. Meat and Poultry Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4 ed. Washington APHA, 2001. 676 p. cap. 45, p. 463-471.

TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa Cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4985-4995, 2003.

VAN DIEMEN, P. M.; DZIVA, F.; STEVENS, M. P.; WALLIS, T. S. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 3, p. 1735-1743, 2005.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. In: \_\_\_\_\_. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London: Mosby Year Book, 1991. p. 101-128.

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

VERWEYEN, H. G.; KARCH, H.; BRANDIS, M.; ZIMMERHACKL, L. B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. **Pediatric Nephrology**, Heidelberg, v. 14, n. 1, p. 73-83, 2000.

WAHLSTRÖM, H. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157. In: **Zoonoses in Sweden up to and including 1999**. Uppsala: Reklan & Katalogtryck, 2001. p. 19-22.

WANG, G.; CLARK, C. G.; RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3613-3619, 2002.

WOODWARD, M. J.; CARROL, P. J.; WRAY, C. Detection of entero and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 2-3, p. 251-261, 1992.

YE, C.; XU, J. Prevalence of Iron Transport Gene on Pathogenicity-Associated Island of Uropathogenic *Escherichia coli* in *E. coli* O157:H7 Containing Shiga Toxin Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n.6, 2001.

## APÊNDICE

**Apêndice 1.** Identificação do animal, da propriedade rural, da cidade e do Estado de origem dos 50 animais amostrados, de janeiro a abril de 2011.

<b>Nº do Animal</b>	<b>Identificação da Propriedade rural</b>	<b>Cidade - Estado</b>
1	1	Mira-Estrela – SP
2	2	Poloni – SP
3	3	Auriflora – SP
4	4	Três Fronteiras – SP
5	5	Três Fronteiras – SP
6	6	Frutal – MG
7	7	Mogi-Guaçu – SP
8 ao 11	8	Rifaina – SP
12	9	Frutal – MG
13 ao 18	8	Rifaina – SP
19 ao 25	10	Catalão – GO
26 e 27	11	Itobi – SP
28 ao 32	12	São João da Boa Vista – SP
33 ao 35	13	Comendador Gomes – MG
36 ao 40	14	Frutal – MG
41	15	Frutal – MG
42 ao 49	16	Cardoso – SP
50	17	Batatais – SP