

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Escherichia coli*, PRODUTORAS DE SHIGATOXINAS,
DETECTADAS EM FEZES DE BOVINOS LEITEIROS E EM
DIFERENTES PONTOS DO PROCESSO DE ORDENHA**

Hinig Isa Godoy Vicente

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de
Doutor em Medicina Veterinária – Área de
concentração em Medicina Veterinária
Preventiva.**

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

- Maio 2006 -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

HINIG ISA GODOY VICENTE – Nascida aos 21 de Julho de 1977 na cidade de São Paulo - SP. Concluiu o Segundo Grau no Colégio Adventista de Santo André, em dezembro de 1994. Iniciou o curso de Medicina Veterinária, em março de 1996, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, concluído em dezembro de 2000. Durante o curso de graduação, participou do Programa Especial de Treinamento Pet/Caps Medicina Veterinária, de setembro de 1996 a dezembro de 1998. De maio de 1998 a abril de 1999, realizou seu primeiro trabalho de iniciação científica, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, intitulado: Estudo Comparativo da Qualidade Higiênico-Sanitária e da Demanda de Cloro em Amostras de Água de Dessedentação de Galinhas de Postura Colhidas em dois Modelos de Bebedouros Tipo Nipple. Sua segunda bolsa de iniciação científica da FAPESP teve início em junho de 2000 e término em dezembro do mesmo ano, com a apresentação do Trabalho de Graduação intitulado: Avaliação da Eficiência do Processo de Desinfecção de Teteiras por Imersão em Solução Desinfetante Utilizando duas Fontes de Cloro. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária na FCAV – UNESP de Jaboticabal, em 2001 e obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária Preventiva em fevereiro de 2003, com a dissertação intitulada: *Escherichia coli* shigatoxigênicas pertencentes aos sorogrupos O157, O111 e O113, detectadas em fezes de bovinos, água e leite de propriedades leiteiras, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Em março de 2003 iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva, com bolsa Capes.

“Somos o que repetidamente fazemos.

A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito.”

Aristóteles

Dedico,

A Deus, em primeiro lugar, Supremo Criador, doador e mantenedor da vida, que me deu capacidade para realizar este trabalho.

Ao meu marido, pelo companheirismo em todos os momentos, inclusive algumas madrugadas frias de colheita!!! Por ser meu melhor amigo, pelo carinho, compreensão e principalmente amor que a mim tem dedicado.

À minha querida mãe, que mesmo longe está sempre perto. Tudo o que sou e tudo o que conquistei devo a ela.

AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, não só pela orientação e ensino, mas também pelo apoio e confiança.

Aos Profs. Dra. Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, Dra. Maria da Glória Buzinaro, Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Dra. Elma Pereira dos Santos Polegato, Dra. Naiá Carla Machi de Rezende e Dr. Raul José Silva Gírio pelas palavras de incentivo e sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

À Liliana Biondi Naka e Waldemar Dibelli Júnior, pelo auxílio em vários momentos.

Às queridas Poliana de Castro Mello, Ana Paula Nunes e Cíntia Sobue Lorenzon pelo tempo despendido em me ajudar.

À preciosa amiga Ana Lígia Lordello Cortez por estar sempre presente!!!

Aos amigos Luciano Ferreira, Natacha Cereser, Viviane de Souza e Thaís Martineli por terem tornado meus momentos de trabalho muito mais agradáveis!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xviii
RESUMO	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Amostragem	12
4.2. Colheita de Amostras	13
4.2.1. Amostras de água (n=41)	13
4.2.2. Amostras de fezes dos bovinos (n=467)	14
4.2.3. Amostras de leite (n=30)	14
4.2.4. Amostras de orifício do teto (n=28)	14
4.2.5. Amostras de insuflador de ordenhadeira (n=6)	14
4.2.6. Amostras de mãos do ordenhador (n=28)	15
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	16
4.3.1. Preparo das amostras	16
4.3.2. PCR multiplex <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>eae</i>	17
4.3.3. PCR Multiplex <i>rfb</i> O157, O113, O111	18
4.3.4. Isolamento de <i>Escherichia coli</i> O157	19
4.3.5. PCR multiplex <i>rfb</i> O157 e <i>hlyA</i>	20
4.3.6. Isolamento de <i>Escherichia coli</i> O113	21
4.3.7. PCR <i>rfb</i> O113	21
4.3.8. Isolamento de <i>Escherichia coli</i> O111	22
4.3.9. PCR <i>rfb</i> O111	23
5. RESULTADOS	24

<u>6. DISCUSSÃO</u>	40
<u>7. CONCLUSÕES</u>	60
<u>8. REFERÊNCIAS</u>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - “attaching and effacing”

APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPW - Buffer Pepton Water

CDC - Centro de Controle de Doenças

CH – Colite Hemorrágica

CT-SMAC - Sorbitol MacConkey Agar com cefixima e telurito

DAEC - *E. coli* difuso-aderente

eae – gene que codifica a proteína Intimina

EAggEC - *E. coli* enteroagregativa

EHEC - *E. coli* enterohemorrágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

EPEC - *E. coli* enteropatogênica

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica

FDA – Food and Drug Administration

GN- Bacto GN broth

hly – gene que codifica a enterohemolisina

IAL – Instituto Adolf Lutz

IMS - Separação imunomagnética

PTT - Púrpura Trombocitopênica Trombótica

PBS-T - Phosphate buffer saline with tween 20

PBS-D - Phosphate buffer saline

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

rfb – loci que codifica o antígeno O

SHU - Síndrome Hemolítica Urêmica

STEC - *E. coli* shigatoxigênica

Stx1 – Shigatoxina 1

Stx2 – Shigatoxina 2

*stx*₁ – gene que codifica Shigatoxina 1

*stx*₂ – gene que codifica Shigatoxina 2

TSA - Tryptic soy agar

TSB - Tryptic soy broth

LISTA DE TABELAS

	Página
<u>TABELA 1 – Número de cada tipo de amostras colhidas nas propriedades visitadas. ...</u>	15
<u>TABELA 2 – Coeficientes de prevalência (CP) de seqüências <i>stx</i> (STEC) e <i>rfb</i> O113, O111 e O157 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>TABELA 3 – Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência <i>stx</i> de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>TABELA 4 - Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência <i>rfb</i> O157 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>TABELA 5 - Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência <i>rfb</i> O111 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>TABELA 6 - Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência <i>rfb</i> O113 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>TABELA 7 - Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal que não apresentaram seqüências <i>stx</i> (STEC-) e que apresentaram seqüências <i>stx</i> (STEC) e <i>rfb</i> O157, O111, O113 de <i>Escherichia coli</i>, detectadas por reação em cadeia da polimerase, provenientes de bovinos com diarreia e sem diarreia. Jaboticabal-SP, 2003.</u>	Erro! Indicador não definido.

TABELA 8- Número de amostras de fezes de bovinos com diarreia, do Município de Jaboticabal, que apresentaram, no crescimento bacteriano seqüências *stx* (STEC), *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003. **Erro! Indicador não definido.**

TABELA 9 – Coeficiente de prevalência de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli* em amostras de água de propriedades rurais, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003. **Erro! Indicador não definido.**

TABELA 10 – Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos, água e leite de propriedades do Município de Jaboticabal, O157 positivas, detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR O157 positivas), isoladas por separação imunomagnética (IMS positivas), que apresentaram o gene *hly* (HLY positivas). Jaboticabal-SP, 2003. **Erro! Indicador não definido.**

TABELA 11- Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos, água e leite de propriedades do Município de Jaboticabal O113 positivas, detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR O113 positivas) e isoladas (Isoladas). Jaboticabal-SP, 2003...... **Erro! Indicador não definido.**

TABELA 12 - Número e porcentagem de rebanhos, que apresentaram, no crescimento bacteriano de amostras de fezes de bovinos, seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 – Coeficientes de prevalência de seqüências <i>stx</i> e <i>rfb</i> O113, O111 e O157 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 2 - Coeficientes de prevalência de seqüência <i>stx</i> de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 3- Coeficientes de prevalência de seqüência <i>rfb</i> O157 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 4- Coeficientes de prevalência de seqüência <i>rfb</i> O111 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 5- Coeficientes de prevalência de seqüência <i>rfb</i> O113 de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 6- Coeficiente de prevalência de seqüências <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos STEC positivas e coeficiente de prevalência de seqüência <i>eae</i> de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 7- Coeficiente de prevalência de seqüência <i>stx</i> ₁ de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes <i>stx</i> positivas, de bovinos de diferentes faixas etárias, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.	Erro! Indicador não de

FIGURA 8- Coeficiente de prevalência de seqüência *stx*₂ de *Escherichia coli* em amostras de fezes *stx* positivas, de bovinos de diferentes faixas etárias, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 9 - Coeficiente de prevalência de seqüências *stx*₁/*stx*₂ de *Escherichia coli* em amostras de fezes *stx* positivas, de bovinos de diferentes faixas etárias, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 10– Coeficiente de prevalência seqüência *eae* de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos, de diferentes faixas etárias, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 11– Coeficiente de prevalência de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli* em amostras de água de propriedades rurais, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 12- Coeficiente de prevalência de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli* em amostras de leite de propriedades rurais, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 13– Coeficiente de prevalência de seqüência *stx* de *Escherichia coli* em amostras de leite, água, teto de animais, mão de ordenhador e bocal de ordenhadeira de propriedades rurais, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 14- Porcentagens de rebanhos, que apresentaram, no crescimento bacteriano de amostras de fezes de bovinos, seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase, em relação aos negativos. Jaboticabal-SP, 2003.**Erro! Indicador não definido.**

***Escherichia coli*, PRODUTORAS DE SHIGATOXINAS,
DETECTADAS EM FEZES DE BOVINOS LEITEIROS E EM DIFERENTES PONTOS
DO PROCESSO DE ORDENHA**

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *Escherichia coli* produtoras de shigatoxinas e *E. coli* dos sorogrupos O157, O111 e O113 em rebanhos leiteiros do Município de Jaboticabal-SP. A presença de seqüências *stx*₁, *stx*₂ e *eae* foi detectada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de fezes, água, leite, mão de ordenhador, insuflador de ordenhadeira e teto. Todas as amostras *stx* e *eae* positivas foram submetidas a uma nova reação de PCR para detecção das seqüências *rfb* O157, O111 e O113. Observou-se uma alta prevalência (72,16%) de seqüências *stx* nas fezes dos bovinos. Os coeficientes de prevalência das seqüências *rfb* O157, O111 e O113 nas fezes dos bovinos foram, respectivamente, 14,77%, 0,2% e 30,83%. Detectaram-se seqüências *stx* em amostras de água (19,51%), leite (33,33%), mão de ordenhador (3,57%), e teto (7,14%). Ainda nas amostras de água e leite foram detectadas *Escherichia coli* O157 e O113. Por meio da separação imunomagnética, isolou-se 53,62% das amostras PCR O157 positivas, sendo destas 72,97% produtoras de enterohemolisina. Foram isoladas 25% das amostras PCR O113 positivas. Animais de todos os rebanhos (100%) apresentaram em suas fezes STEC e *E. coli* O113 e os sorogrupos O157 e O111 foram observados em 60,0% e 10,0% dos rebanhos, respectivamente. Concluiu-se que a alta prevalência de STEC detectada em rebanho leiteiro evidenciou que as fezes de bovinos desempenham um papel importante na contaminação ambiental e podem oferecer risco de agravo à saúde pública.

Palavras-Chave: shigatoxigênica, prevalência, *E. coli* O157, *E. coli* O111, *E. coli* O113.

***Escherichia coli*, SHIGATOXIN PRODUCING, DETECTED IN DAIRY CATTLE
FECES AND IN DIFFERENT POINTS FROM MILKING**

ABSTRACT - The objective of this study was to determine the prevalence of Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) and STEC serogroups O157, O111 and O113 in feces, water, milk, milkman's hands, teat and teatcup sampled in dairy farms in Jaboticabal-SP. Samples were collected from 10 herds and assessed for the presence of the virulence genes *stx*₁, *stx*₂ and *eae* by polymerase chain reaction (PCR). All *stx* and *eae* positive samples were submitted to a second PCR reaction targeting the sequences *rfb* O157, *rfb* O111 and *rfb* O113. High prevalence of *stx* was detected (72,16%) in fecal samples, whereas the prevalence of sequences *rfb* O157, *rfb* O111 and *rfb* O113 were 14,77%, 0,2% and 30,83%, respectively. Sequence *stx* was detected in water (19,51%), milk (33,33%), milkman's hands (3,57%) and teat samples (7,14%). It was also detected *Escherichia coli* O157 and O113 in water and milk samples. It was isolated, by immunomagnetic separation, 53,62% of the PCR positive samples, from these, 72,97% were enterohaemolytic. 25% of the O113 PCR positive samples were isolated. STEC was identified in all herds (100%), and serogroups O157, O111 and O113 were observed in 60%, 10% and 100% of the herds, respectively. In conclusion, the high STEC prevalence detected in dairy herds evidences that bovine feces might play an important role as a contamination source in the region of Jaboticabal.

Keywords: *E coli* O157, *E coli* O111, *E coli* O113, prevalence, Shigatoxigenic.

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli são pequenos bastonetes Gram negativos que fazem parte da microbiota normal do intestino de mamíferos. A maioria das cepas são úteis ao organismo, pois sintetizam algumas vitaminas e suprimem o desenvolvimento de outras espécies patogênicas. Sabe-se que algumas cepas produzem citotoxinas muito potentes, chamadas Shigatoxina 1 e Shigatoxina 2 e são capazes de aderir à mucosa intestinal.

Dentre as cepas de *Escherichia coli* que produzem Shigatoxinas, classificadas como *E. coli* shigatoxigênicas (STEC), existem algumas que são altamente patogênicas aos seres humanos, entre estas, encontram-se *E. coli* pertencentes aos sorogrupos O157, O111 e O113. Estes microrganismos são uma ameaça à saúde pública uma vez que as patologias por eles provocadas são, geralmente, de natureza grave, como por exemplo, a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem ser fatais, principalmente para crianças e idosos.

Desde 1982, quando foi relatado o primeiro surto causado por STEC, até os dias atuais, inúmeros outros surtos e casos esporádicos têm sido descritos, em sua maioria provocados pela ingestão de produtos de origem bovina, principalmente carne moída e hambúrgueres crus ou mal cozidos. Outros meios de transmissão são o leite e seus derivados, a água, tanto de bebida como recreacional e diversos alimentos incluindo frutas e verduras. A transmissão de pessoa à pessoa, assim como de animal à pessoa, também é possível.

Os bovinos são o principal reservatório de STEC, eliminando-as por meio de suas fezes, que de maneira direta ou indireta atingem a cadeia alimentar dos seres humanos, podendo imputar-lhes agravo à saúde.

Em nosso país pouco se sabe a respeito da ocorrência desses microrganismos no rebanho bovino produtor de leite, sobre sua epidemiologia e, principalmente, sobre os meios pelos quais eles se disseminam durante o processo de ordenha e no ambiente rural, tornando-se fatores de risco aos seres humanos.

Com a finalidade de esclarecer algumas dessas questões, em âmbito municipal, foi realizada esta pesquisa, que também forneceu dados que poderão ser utilizados para melhor direcionar as medidas de controle desses importantes patógenos em propriedades leiteiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os isolados de *Escherichia coli* são diferenciados sorologicamente com base em antígenos de superfície, que permitem a sorotipagem: O (somático), H (flagelar) e K (capsular). A maioria das cepas de *E. coli* são comensais inofensivos, entretanto, algumas são patogênicas ao ser humano (DOYLE et al., 1995).

As cepas patogênicas de *E. coli* são classificadas em grupos específicos com base em sua virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromes clínicas e diferentes sorogrupos O:H. Esta classificação inclui: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difuso-aderente (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (DOYLE et al., 1995).

Todas as EHEC produzem fatores citotóxicos a células Vero de rim de macaco verde africano, os quais foram descritos inicialmente como Verotoxinas e, atualmente, Shigatoxinas, em função da similaridade com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (DOYLE et al., 1995). Por este motivo, fazem parte do grupo de *E. coli* shigatoxigênicas (STEC).

O trabalho pioneiro que liderou a descoberta das STEC foi feito por Konowalchuk e colaboradores, no final da década de 70, no Canadá. Enquanto investigavam a utilidade das células Vero para detecção de enterotoxinas termolábeis de *E. coli*, eles observaram que algumas cepas de *E. coli* produziam um efeito citopático irreversível nas células Vero, contrastando com o efeito citotônico reversível da enterotoxina termolábil. Essa observação fez com que Konowalchuk e seus colaboradores suspeitassem que a citotoxina produzida por essas cepas pudesse contribuir para a ocorrência de doenças diarréicas. Essas descobertas foram exploradas na Inglaterra e Índia, em dois estudos clínicos que investigaram a frequência de STEC nas fezes de pacientes com diarreia. Esses estudos, entretanto, falharam em demonstrar a importância etiológica das STEC em doenças diarréicas e a importância patogênica da Shigatoxina (KARMALI, 1989).

Apenas em 1982, quando houve um surto no Oregon, com 26 casos e 19 pessoas hospitalizadas, apresentando diarreia sanguinolenta e dor abdominal intensa,

associados à ingestão de hambúrguer mal passado de uma rede de restaurantes “fast-food”, seguido, após três meses, por outro surto envolvendo a mesma rede de “fast-food”, em Michigan, é que o Centro de Controle de Doenças (CDC) em Atlanta, após investigação epidemiológica, atribuiu o surto a um sorotipo de *E. coli*, na época considerado raro, a *Escherichia coli* O157:H7 (KARMALI, 1989, DOYLE et al., 1995).

A partir de então, vários surtos e casos isolados têm sido relatados, envolvendo não só *E. coli* O157:H7, sorotipo predominante em doenças associadas às EHEC, como também *E. coli* pertencentes a outros sorogrupos. Estima-se que nos Estados Unidos da América ocorram anualmente, 73.000 casos de infecção por *E. coli* O157:H7, com 2.168 hospitalizações e 61 mortes (CDC, 2006b).

A variedade de agravos à saúde provocados pela infecção com STEC inclui diarreia sem sangue, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT).

Os sintomas da colite hemorrágica iniciam-se com uma fase prodrômica que consiste em cólicas abdominais intensas seguidas por um ou dois dias de diarreia aquosa abundante, que progride para sanguinolenta, com presença de coágulos, não acompanhada de leucócitos nas fezes, manifestando-se em pacientes sem febre. A doença, geralmente, é autolimitante, durando em média oito dias (RILEY et al., 1983, FDA, 1999). Estas características a distinguem da disenteria clássica causada por *Shigella sp.* ou *E. coli* enteroinvasiva, que são caracterizadas por febre alta, toxemia, fezes com pouco sangue e muco contendo muitos leucócitos (DUPONT et al., 1971).

Em uma parte dos pacientes a infecção por STEC progride para síndrome hemolítica urêmica que, embora acometa pessoas de todas as idades, afeta principalmente crianças, sendo neste grupo a mais importante causa de falência renal (DOYLE et al., 1995). A síndrome é definida por um início súbito de anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda após o aparecimento de sintomas no trato respiratório superior, estômago ou intestinos (FONG et al., 1982, KARMALI et al., 1985). De 5% a 10% das vítimas de diarreia por *E. coli* O157:H7 podem desenvolver SHU, podendo resultar em perda permanente das funções renais (KARMALI, 1989, GRIFFIN & TAUXE, 1991). Dentre os pacientes com SHU, 3% a 5% morrem (MEAD & GRIFFIN, 1998); cerca de 30% dos que se recuperam podem apresentar danos

permanentes como insuficiência renal crônica, hipertensão e deficiência neurológica (KARMALI, 1989, TARR, 1995). Em idosos, pode ocorrer a síndrome hemolítica urêmica somada a outros sintomas como febre, sintomas neurológicos e púrpura trombocitopênica, resultando em mortalidade superior a 50% (FDA, 1999).

A púrpura trombocitopênica trombótica é muito semelhante à SHU em suas características clínico-patológicas; entretanto, sinais neurológicos resultantes de coágulos sangüíneos no cérebro e febre são mais evidentes na PTT, além do que, a púrpura trombocitopênica é mais comum em adultos que em crianças (KARMALI, 1989).

Alguns indivíduos infectados com STEC podem permanecer assintomáticos, apesar da presença, em grande quantidade, tanto de microrganismos quanto de toxina nas fezes (BRIAN et al., 1992). No entanto, pouco é conhecido sobre a incidência de portadores sãos.

O mecanismo de patogenicidade das STEC é complexo e envolve vários fatores de virulência. A maior parte da patogênese é atribuída ao efeito sistêmico das Shigatoxinas, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese protéica em células do endotélio microvascular (NATARO & KAPER, 1998, PATON & PATON, 1998). O dano que estas toxinas provocam nestas células ativa a coagulação intravascular que conduz às principais manifestações de SHU (TARR et al., 2005). Uma dessas toxinas, Shigatoxina 1 (Stx1), é imunologicamente indistinguível da potente citotoxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1, e mais de 99% das suas seqüências de nucleotídeos são homólogas; por isso reage e é neutralizada por anticorpos contra Shigatoxina. Muitas cepas também produzem uma segunda potente citotoxina, a Shigatoxina 2 (Stx2), imunologicamente distinta da Stx1 e seus genes são homólogos em apenas 58% das seqüências de nucleotídeos (LEVINE, 1987, JINNEMAN et al., 1995). Estudos epidemiológicos indicam que as cepas de STEC que produzem somente Stx2 estão mais comumente associadas a doenças graves em seres humanos do que aquelas que produzem somente Stx1 ou Stx1 e Stx2 (OSTROFF et al., 1989b). Uma possível explicação para este fato é que o nível de transcrição do gene *stx₂*, que codifica a toxina Stx2, “in vivo”, é maior que o do *stx₁* (WEINSTEIN et al., 1988).

Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* produzam Shigatoxina, somente um limitado, mas crescente número, é considerado patogênico ao homem. O sorotipo O157:H7 é o predominante entre as *Escherichia coli* enterohemorrágicas e o mais freqüentemente associado a surtos de origem alimentar (VOLD et al., 1998).

Ainda com relação a patogenicidade, não existe dúvida de que há uma forte associação entre a presença do gene *eaeA* e a capacidade de cepas de STEC causarem doenças graves em humanos. O gene *eaeA* codifica uma proteína externa de membrana (OMP), denominada Intimina, que é um fator de virulência mediador no ataque ao enterócito, produzindo uma lesão intestinal do tipo “attaching and effacing” (AE); “attaching” indica uma íntima adesão da bactéria à superfície do enterócito e, “effacing”, o desaparecimento localizado das microvilosidades da borda em escova (MOON et al., 1983, WILLSHAW et al., 1994, CHINA et al., 1996). Essa lesão do tipo AE é muito semelhante à produzida por sorotipos clássicos de EPEC (MOON et al., 1983, TZIPORI et al., 1985).

Outro fator de virulência produzido pelas EHEC é a hemolisina, codificada pelo gene *hlyA* (FAGAN et al., 1999). A maneira como ela contribui para a patogênese das doenças causadas por STEC ainda não está muito bem esclarecida. Uma alternativa seria que a hemoglobina liberada pela ação da hemolisina provê uma fonte de ferro que talvez estimule o crescimento das STEC no intestino (LAW & KELLY, 1995).

Os bovinos são o reservatório mais importante desse tipo de microrganismo (BESSER et al., 1997). Têm sido isoladas cepas de *E. coli* O157:H7 do rebanho envolvido com o surto, com perfis moleculares idênticos aos de cepas isoladas de humanos afetados (KARMALI, 1989, GRIFFIN & TAUXE, 1991).

Particularmente bezerros durante o desmame e novilhas têm sido incriminados como o grupo mais suscetível a *Escherichia coli* O157:H7 e outras STEC. Portanto, a presença desse microrganismo em amostras fecais provenientes desse grupo de animais é maior que em bovinos adultos (GRIFFIN & TAUXE, 1991; WELLS et al., 1991; HANCOCK et al., 1994, COBBOLD & DESMARCHELIER, 2000).

Embora existam relatos de isolamento a partir das fezes de bezerros com diarreia (BLANCO, 1988; ORSKOV et al., 1987), o microrganismo é normalmente encontrado em animais saudáveis (WELLS et al., 1991; MONTENEGRO et al., 1990).

O padrão típico de excreção da *Escherichia coli* O157:H7, pelos bovinos, parece ser caracterizado por curtos períodos com uma prevalência relativamente alta de excreção, intercalados com longos períodos de presença reduzida ou não detectável (HANCOCK et al., 1997). BESSER et al. (1997) concordam que a prevalência da *E. coli* O157:H7 pode ser baixa por longos períodos dentro de um rebanho e que rebanhos não afetados podem repentinamente mudar seu estado, excretando o agente durante aproximadamente um mês.

Os dados encontrados por SHERE et al. (1998), de que um animal pode ser reinfectado pela mesma cepa de *E. coli* O157:H7, indicam que há uma baixa proteção imunitária desencadeada pela infecção natural com esta bactéria. Portanto, episódios recorrentes da presença da *E. coli* O157:H7 no rebanho, com uma alta prevalência de infecção, pode indicar exposição recorrente dos animais a alguma fonte deste agente. E, se os fatores que diminuem a resistência à colonização por este microrganismo fossem identificados e eliminados, poderia ser diminuída, substancialmente, a exposição de humanos a este patógeno emergente (BESSER et al., 1997).

Alguns fatores contribuem para a presença e disseminação das STEC no rebanho, tais como, práticas de manejo, dieta, estresse, densidade populacional, região geográfica e sazonalidade (HANCOCK et al., 1994, GARBER et al., 1995, KUDVA et al., 1996, DARGATZ et al., 1997).

Embora os bovinos tenham sido considerados como os principais reservatórios das STEC, estudos epidemiológicos demonstram que tais microrganismos também são prevalentes no trato gastrointestinal de outros animais domésticos como, ovelhas, suínos, cabras, cães, gatos e aves (DOYLE & SCHOENI, 1987, KARMALI, 1989, BEUTIN et al., 1993) e animais silvestres como veados, javalis, gambás, coelhos e racuns (RICE et al., 1995, SHERE et al., 1998, SARGEANT et al., 1999, WAHLSTRÖM, 2001, PRITCHAR et al., 2001, RENTER et al., 2003).

Diferentes variações sazonais em relação a prevalência de STEC têm sido encontradas em diversos estudos e países; HANCOCK et al. (1994) observaram, nos Estados Unidos da América (EUA), picos no verão e outono e períodos de presença extremamente baixa durante o inverno e a primavera, enquanto CHAPMAN et al. (1997), no Reino Unido, obtiveram maiores taxas de isolamento na primavera e verão.

Na Finlândia, as maiores taxas de detecção foram verificadas nos meses mais quentes (LAHTI, 2003). Este padrão sazonal com picos no verão pode contribuir para uma variação semelhante existente na doença humana associada a esse organismo (OSTROFF et al., 1989a).

A maioria dos surtos por STEC está associada ao consumo de alimentos de origem bovina crus ou mal cozidos (DOYLE et al., 1995). Entretanto, uma grande variedade de alimentos está relacionada a doenças causadas por esses microrganismos, como frutas, vegetais, produtos secos ou fermentados, derivados de leite crus ou pasteurizados inadequadamente. A infecção já foi descrita sendo veiculada por alface, brotos de rabanete, alface e feijão, maionese com molho de salada, salada de ervilha, molho de frutos do mar, suco de maçã não pasteurizado, cantalupo, macarrão de trigo-mouro com tampo, batata, rosbife, salame, carne seca, atum cru fatiado, queijo, iogurte, manteiga e creme não pasteurizado (DOYLE et al., 1995, PATON & PATON, 1998, SPARLING, 1998, FUKUSHIMA et al., 1999, SAFARIKOVA & SAFARÍK, 2001, HUSSEIN & SAKUMA, 2005, CDC, 2006b).

A baixa dose infectante necessária para provocar doença possibilita a transmissão pessoa-a-pessoa, existem vários relatos desse tipo de transmissão, principalmente em creches. A transmissão também pode ocorrer através da água utilizada para beber, da água recreacional, usada para nadar e por meio do contato direto ou indireto entre pessoas e animais (SWERDLOW et al., 1992, DOYLE et al., 1995, PATON & PATON, 1998, COIA, 1998, CDC, 2006a).

Existem muitos relatos indicando a associação entre o consumo de leite cru e a colite hemorrágica ou a síndrome hemolítica urêmica (KIRK et al., 1997). Em uma pesquisa realizada, no Reino Unido, CHAPMAN et al. (1993), confirmaram microbiologicamente, pela primeira vez, o leite não tratado como fonte de *E. coli* O157. Até mesmo o leite tratado pode estar contaminado, se a pasteurização for inadequada ou ocorrer contaminação pós-pasteurização. Resultados obtidos por KATIC & RADENKOV (1998) indicaram que a *E. coli* O157:H7 sobrevive em leite pasteurizado, contaminado artificialmente com este sorotipo, mantido a 7°C e a 20°C, por mais de 21 dias.

MATTHEWS et al. (1997), estudando a invasão das células epiteliais bovinas por

Escherichia coli O157:H7 shigatoxigênica, observaram que todas *E. coli* O157:H7 isoladas e avaliadas demonstraram habilidade em penetrar nas células epiteliais da glândula mamária de bovinos. Este processo é importante, pois os bovinos podem, por meio desta via, contaminar o leite cru. Além disso, a localização intracelular da bactéria no tecido mamário pode servir como reservatório da bactéria para contaminação de trabalhadores, equipamentos e carcaças no momento do abate.

Em muitos casos, a água é tida como uma das principais vias de transmissão de agentes causadores de doenças para os animais domésticos, principalmente bovinos, suínos e aves. Algumas dessas enfermidades, segundo SOUZA et al. (1983), representam fatores importantes à economia e à Saúde Pública, pois podem acarretar prejuízos econômicos, às vezes muito altos, e vários dos seus agentes causais podem ser transmitidos ao ser humano.

HANCOCK et al. (1998) acreditam que devido à alta prevalência de *E. coli* O157 observada em bebedouros animais, este agente possivelmente pode ter um outro reservatório ambiental, como a camada sedimentária dos bebedouros, uma vez que várias cepas da *E. coli*, inclusive *E. coli* O157, são capazes de multiplicar-se no ambiente se houver uma fonte de nutrientes.

Estudos realizados por RANDALL et al. (1999) e por outros autores indicam que a *E. coli* shigatoxigênica O157 pode sobreviver por longos períodos no ambiente rural. Sendo assim, o ambiente da propriedade rural pode ser considerado como uma potencial fonte direta de *E. coli* O157 para humanos, como verificado por RENWICK et al. (1993) que relataram a transmissão da *Escherichia coli* O157:H7 a uma criança exposta a bezerros infectados, e por RICE et al. (1996) que constatarem a bactéria nas fezes de um garoto que apresentava severa diarreia sanguinolenta e estava diretamente ligado a criação do rebanho.

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 & TAUXE, 1991). A dose infectante pode ser de apenas 10 bactérias, que não precisam multiplicar-se no alimento, sendo a contaminação original já suficiente para causar doença (WAHLSTRÖM, 2001). 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 25g constitui uma carne bovina com risco à saúde pública (JOHNSON et al., 1998).

Portanto, para assegurar a qualidade de produtos cárneos, programas de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) foram introduzidos na indústria de processamento deste tipo de alimento. Estes programas envolvem a identificação de pontos críticos para contaminação ou transmissão de patógenos e a introdução de estratégias de controle nesses pontos críticos. Há um considerável interesse em estender os programas APPCC às propriedades rurais, para minimizar os riscos da *Escherichia coli* O157:H7 ou outras bactérias que causam doença de origem alimentar entrarem na cadeia alimentar humana. Entretanto, pouco é conhecido sobre a relação natural entre *E. coli* O157:H7 e o ambiente, fazendo-se necessário um maior conhecimento em nível de propriedade rural a fim de identificar pontos críticos de controle (CULLOR, 1997).

Em trabalho realizado no Rio de Janeiro, foi observada uma alta ocorrência (82%) de *E. coli* shigatoxigênica em rebanho leiteiro (CERQUEIRA et al., 1999). Além disso, a alta incidência de STEC em produtos cárneos crus, encontrada na cidade do Rio de Janeiro, podem representar um potencial risco à saúde pública (CERQUEIRA et al., 1997). Talvez, também se aplique em nosso país a afirmação de SWERDLOW et al. (1992) de que as infecções, não só com *E. coli* O157, mas também com O111 e O113, possam estar sendo subdiagnosticadas devido à falta de exames de fezes de rotina que detectem esses organismos.

Devido à escassez de dados em nível nacional a respeito desses patógenos, é que se propôs a realização do presente projeto, a fim de verificar a prevalência de STEC em propriedades leiteiras. Assim, serão obtidas mais informações sobre a epidemiologia desses patógenos emergentes, que poderão dar subsídios a medidas de controle que diminuam a colonização intestinal dos animais por esses microrganismos, e também seus níveis no ambiente, baixando conseqüentemente, os riscos de infecção para o ser humano.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Verificar a prevalência de *Escherichia coli* shigatoxigênica e dos sorogrupos O157, O111 e O113, em propriedades leiteiras do Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

- | Avaliar o coeficiente de prevalência de STEC, *E. coli* O157, O111 e O113 por faixa etária no rebanho bovino.
- | Determinar o coeficiente de prevalência das seqüências *stx* e *eae* de *E. coli* nas fezes dos bovinos.
- | Investigar a presença destes patógenos intestinais na água utilizada nas propriedades, no leite retirado dos animais, nas mãos do ordenhador, no teto dos animais e nos insufladores de ordenhadeira.
- | Isolar as cepas de *Escherichia coli* O157, O111 e O113 detectadas por PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

O universo da pesquisa foi o rebanho bovino leiteiro do Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, constituído por 5907 animais, distribuídos em 196 propriedades rurais.

As propriedades praticavam o regime semi-extensivo de produção e os rebanhos eram constituídos por animais mestiços. Os sistemas de ordenha utilizados foram o mecânico, em duas propriedades e, o manual, no restante.

A amostragem foi por conglomerado, onde cada rebanho de uma propriedade representa um conglomerado. Foi extraída uma amostra aleatória simples de dez rebanhos e colhidas amostras de fezes de bovinos a eles pertencentes.

O tamanho (n) da amostra de fezes foi calculado, assumindo-se que as variáveis em estudo seguem distribuição binomial, com 99% de confiança de se detectar pelo menos um indivíduo afetado pelo sorotipo O157:H7, que apresenta prevalência mais baixa que a *E. coli* shigatoxigênica, por meio da seguinte fórmula (MIGUEL, 1982), admitindo-se que a prevalência da *E. coli* O157:H7 seja 1% (VOLD, et al. 1998):

$$n = \frac{\ln(1 - \alpha)}{\ln(1 - p)}, \quad \text{sendo} \quad \nabla \alpha = \text{nível de confiança}$$

$$p = \text{prevalência}$$

$$n = \frac{\ln(1 - 0,99)}{\ln(1 - 0,01)} = \frac{\ln 0,01}{\ln 0,99} = \frac{-4,605}{-0,010} = 460$$

Além das amostras de fezes de bovinos, foram colhidas também, amostras de água, leite, mãos de ordenhador, insuflador de ordenhadeira e orifício de teto, durante o período de estiagem, entre julho e agosto de 2003, totalizando 600 elementos amostrais.

Os resultados das amostras de fezes foram analisados considerando-se três faixas etárias: bezerros (< 4 meses), novilhas (de 5 meses a 2 anos) e vacas (>2 anos).

4.2. Colheita de Amostras

4.2.1. Amostras de água (n=41)

Foram colhidas amostras de água não tratada de até seis pontos distintos, em cada propriedade: fonte (poço raso, mina ou poço profundo), consumo humano, estábulo leiteiro e bebedouros de vacas, novilhas e bezerros. A colheita foi feita em frascos esterilizados com capacidade para 500mL, até o preenchimento de 2/3 de seu volume (APHA, 1992).

Fonte:

Poço Raso: as amostras foram colhidas após deixar escoar, por 3 minutos, a água da torneira ligada diretamente ao poço, tomando-se o devido cuidado para que a colheita se realizasse de maneira asséptica.

Mina: as amostras foram colhidas diretamente da torneira, de maneira semelhante ao item anterior, nas propriedades em que havia o sistema de bomba d'água. Na ausência deste sistema, as amostras foram colhidas pela imersão do frasco, a aproximadamente 20cm de profundidade da superfície da mina, com movimentos para frente e em semicírculo.

Poço profundo: as amostras foram colhidas da torneira localizada antes do reservatório.

Consumo Humano: foram colhidas diretamente da torneira, filtro ou moringa.

Estábulo Leiteiro: as amostras foram colhidas diretamente da torneira localizada no interior do estábulo.

Bebedouros animais: as amostras foram colhidas submergindo o frasco de colheita na água do bebedouro e realizando movimentos para frente e em semicírculo; o material foi colhido, preferencialmente, dos bebedouros que permitiam o acesso aos animais que seriam amostrados.

4.2.2. Amostras de fezes dos bovinos (n=467)

As amostras de fezes foram colhidas com suabe retal de todos os bovinos, com ou sem diarreia, de cada propriedade, com exceção de uma, em que foram colhidas amostras dos animais colocados a disposição pelo proprietário. O meio de cultura Cary-Blair (Copan, Itália) foi utilizado para o transporte das amostras (CERQUEIRA et al., 1999).

4.2.3. Amostras de leite (n=30)

Em cada propriedade foram colhidas, diretamente do tanque de resfriamento de leite, pela torneira de saída do produto, ou diretamente dos latões de leite, três amostras durante todo processo de ordenha, sendo uma no início, uma no meio e outra no fim, utilizando frascos esterilizados com capacidade para 500mL, até o preenchimento de 2/3 de seu volume.

4.2.4. Amostras de orifício do teto (n=28)

As amostras foram colhidas de animais no início, meio e fim da ordenha, com o auxílio de suabe estéril, utilizado para os quatro tetos, em movimentos circulares sobre o óstio (INGAWA et al., 1992), após a limpeza com água realizada pelo ordenhador. Os suabes foram acondicionados em tubos estéreis contendo 5mL de Tryptic soy broth (TSB - Oxoid, England) para o transporte. Em uma das propriedades foi colhida apenas uma amostra, pois nesta só havia um animal a ser ordenhado.

4.2.5. Amostras de insuflador de ordenhadeira (n=6)

Friccionando-se em movimentos circulares o suabe estéril no interior de cada um dos quatro insufladores do conjunto de teteiras, por toda extensão que entra em contato com o teto do animal (MCDONALD et al., 1993), foram colhidas três amostras em cada propriedade que possuía o sistema de ordenha mecânica, no início, meio e fim do processo.

4.2.6. Amostras de mãos do ordenhador (n=28)

As amostras das mãos do ordenhador foram colhidas friccionando-se os suabes por toda a extensão das palmas das mãos. Foram colhidas três amostras em cada propriedade, no início, meio e fim da ordenha. Em uma das propriedades foi colhida apenas uma amostra, pois nesta só havia um animal a ser ordenhado.

Todas as amostras colhidas foram levadas ao laboratório em caixas de material isotérmico, contendo gelo reciclável, sendo processadas imediatamente após a chegada.

Na Tabela 1 encontra-se a quantidade de cada tipo de amostras que foram colhidas nas propriedades visitadas.

TABELA 1 – Número de cada tipo de amostras colhidas nas propriedades visitadas.

Propriedade	N ^o de Amostras						Total
	Fezes	Água	Leite	Mãos	Teto	Insuflador	
1	38	4 ^a	3	3	3	0	51
2	59	3 ^b	3	3	3	0	71
3	93	6 ^c	3	3	3	0	108
4	8	4 ^d	3	3	3	0	21
5	24	4 ^e	3	3	3	0	37
6	18	4 ^f	3	3	3	0	31
7	118	4 ^g	3	3	3	3	134
8	2	2 ^h	3	1	1	0	9
9	6	4 ⁱ	3	3	3	0	19
10	101	6 ^j	3	3	3	3	119
Total	467	41	30	28	28	6	600

^aMina(1), consumo humano(1), bebedouro animal(2)

^bMina(1), poço profundo/estábulo leiteiro(1), córrego/bebedouro animal(1)

^cPoço profundo(1), consumo humano(1), estábulo leiteiro(1), bebedouro animal(3)

^dPoço profundo/consumo humano(1), mina(1), estábulo leiteiro(1), bebedouro animal(1)

^eMina(1), consumo humano(1), estábulo leiteiro(1), bebedouro animal(1)

^fPoço profundo(1), consumo humano(1), estábulo leiteiro(1), bebedouro animal(1)

^gPoço profundo/estábulo leiteiro(1), consumo humano(1), bebedouro animal(2)

^hMina(1), bebedouro animal(1)

ⁱPoço profundo/estábulo leiteiro(1), consumo humano(1), bebedouro animal(2)

^jPoço profundo(1), consumo humano(1), estábulo leiteiro(1), bebedouro animal(3)

As primeiras análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água e a fase de seleção das amostras por PCR foi realizada no Laboratório de Genética das Bactérias, sendo que ambos laboratórios situam-se na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - “Câmpus de Jaboticabal”.

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.3.1. Preparo das amostras

Fezes:

Todas as amostras foram semeadas em ágar cistina lactose eletrólito deficiente (CLED - Difco, France) e levadas à incubação a 37° C por 18-24h., para obtenção de crescimento confluyente. Após esse período, o crescimento polimicrobiano foi coletado em aproximadamente 2mL de tampão fosfato salino (PBS-D; pH 7,4) formando uma suspensão polimicrobiana. Cem microlitros desta suspensão foram então diluídos 10 vezes em água bidestilada ultrapura. O DNA alvo foi obtido pelo aquecimento da suspensão bacteriana diluída, por 10 min. em banho à temperatura de 100° C. Ao mesmo tempo, 0,5mL da suspensão bacteriana concentrada foi misturada a 0,5mL de TSB duplo, com 20% de glicerol, em duplicata, e estocado a -20° C (CERQUEIRA et al., 1999).

Água:

Fonte, consumo humano e estábulo leiteiro - Para essa análise, 100mL das amostras foram filtrados em membrana filtrante esterilizada, com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm (Millipore), que foram depositadas em frascos contendo 50mL de TSB e levadas à incubação por 18-24h. à temperatura de 37° C. Após esse período, as amostras foram semeadas em CLED e os procedimentos seguintes foram os mesmos aplicados às amostras de fezes.

Bebedouro animal - Para cada amostra, 30mL da água do bebedouro foram transferidos para um frasco esterilizado contendo 30mL de TSB (2x concentrado), homogeneizados e incubados à temperatura de 37°C, “overnight”. Após esse período

as amostras foram semeadas em CLED e os procedimentos seguintes foram os mesmos aplicados às amostras de fezes.

Leite:

Para cada amostra, 30mL de leite foram transferidos para um frasco esterilizado contendo 30mL de TSB (2x concentrado), homogeneizados e incubados à temperatura de 37°C, “overnight”. Após esse período, 1mL de cada amostra foi centrifugado, descartado o sobrenadante e semeado o pélete em CLED; os procedimentos seguintes foram os mesmos aplicados às amostras de fezes.

Suabe de orifício de teto, mão de ordenhador e insuflador de ordenhadeira:

Os suabes, depositados em tubos de ensaio contendo 5mL de TSB, foram homogeneizados e levados à incubação por 18-24h. à temperatura de 37°C. Após esse período, 1mL de cada amostra foi centrifugado, descartado o sobrenadante e semeado o pélete em CLED; os procedimentos seguintes foram os mesmos aplicados às amostras de fezes.

4.3.2. PCR multiplex *stx*₁, *stx*₂, *eae*

Uma PCR multiplex previamente descrita (CHINA et al., 1996) foi realizada para detectar seqüências *eae* e *stx*₁, *stx*₂, das *E. coli* shigatoxigênicas, utilizando, respectivamente, os pares de primers ep1 e ep2, *stx*1R e *stx*1F, *stx*2R e *stx*2F (BioSynthesis, USA).

Ep1 – 5' AGG CTT CGT CAC AGT TG 3'

Ep2 – 5' CCA TCG TCA CCA GAG GA 3'

Stx1R – 5' AGA GCG ATG TTA CGG TTTG 3'

Stx1F – 5' TTG CCC CCA GAG TGG ATG 3'

Stx2R – 5' TGG GTT TTT CTT CGG TATC 3'

Stx2F – 5' GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT 3'

A PCR foi realizada utilizando-se um mix que consistia de 2,0μL de tampão PCR 10x (Invitrogen, USA), 0,6μL de solução de MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen, USA), 0,4μL de

dNTP a 2 mM (Invitrogen, USA), 0,1µL (250 mM) de cada primer, 0,2µL da Taq DNA polimerase – (1U Invitrogen, USA), 11,2µL de água bidestilada ultra pura e 5µL do DNA molde, totalizando um volume final de 20µL. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Reserch, Inc), sob as seguintes condições: 94°C por 5'; 30 ciclos a 94°C por 30"; 52°C por 30"; 72°C por 1'30". Foram incluídos controles em todas as reações. Um controle negativo sem DNA foi usado, assim como controles de reação incluindo DNA extraídos de *E. coli* Stx-negativo DH5 α (K12), STEC Stx-positivo cepa E40705 - *stx*₁ e *eae* (CPHL, London) e STEC Stx-positivo cepa E30138 - *stx*₂ e *eae*. Os produtos amplificados foram visualizados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio (Vetec, Brasil). Foi utilizado como referência um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, USA).

4.3.3. PCR Multiplex *rfb* O157, O113, O111

Todas as amostras *stx* e *eae* positivas foram submetidas a uma segunda reação de PCR, de acordo com os procedimentos descritos por PATON & PATON (1999), usando os primers descritos abaixo (BioSynthesis, USA):

O157 F – 5' CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG 3'

O157 R – 5' TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC 3'

O113 F – 5' AGC GTT TCT GAC ATA TGG AGTG 3'

O113 R – 5' GTG TTA GTA TCA AAA GAG GCT CC 3'

O111 F – 5' TAG AGA AAT TAT CAA GTT AGT TCC 3'

O111 R – 5' ATA GTT ATG AAC ATC TTG TTT AGC 3'

A PCR foi realizada utilizando-se um mix que consistia de 2,0µL de tampão PCR 10x (Invitrogen, USA), 0,8µL de solução de MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen, USA), 0,4µL de dNTP a 2mM (Invitrogen, USA), 0,1µL (250 mM) de cada primer, 0,2µL da Taq DNA polimerase (1U Invitrogen, USA), 11µL de água bidestilada ultra pura e 5µL do DNA molde, totalizando um volume final de 20µL. A amplificação foi realizada em termociclador, sob as seguintes condições: 10 ciclos a 95°C por 1'; 65°C por 2'; 72°C por 1'30"; 15 ciclos a 95°C por 1'; 60°C por 2'; 72°C por 1'30"; 10 ciclos a 95°C por 1'; 60°C por 2'; 72°C por 2'30". Foram incluídos controles em todas as reações: controle

negativo sem DNA, *E. coli* Stx-negativo DH5 α (K12), STEC Stx-positivo cepa E40705 ou E30138 (O157), *E. coli* O113:H21 (O113) e EPEC cepa B171 (O111). Os produtos amplificados foram visualizados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1,0% corados com brometo de etídio. Foi utilizado como referência um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, USA).

4.3.4. Isolamento de *Escherichia coli* O157

4.3.4.1. Preparo das amostras

As amostras O157 positivas, estocadas a -20°C foram semeadas em tubos de ensaio contendo 5mL de TSB e incubadas à temperatura de 37°C por 18-20h. Após esse período, 1mL das culturas em TSB foi inoculado em tubos de ensaio contendo 10mL de Bacto GN Broth (GN - Difco, France) sendo essa mistura incubada à temperatura de 37°C por 6h. ou até turvação do meio.

4.3.4.2. Separação Imunomagnética (IMS)

A IMS foi realizada segundo a técnica descrita por WRIGHT et al. (1994).

Foi retirado 1mL da cultura em GN e depositado em eppendorff com 20 μ L de esferas magnéticas contendo anticorpos para o sorogrupo O157 – Dynabeads anti *E. coli* O157 (Dynal, Norway). Os eppendorffs contendo a mistura foram dispostos em um rack apropriado e levados à incubação sob agitação contínua por 30 min. à temperatura ambiente. Uma placa magnética foi inserida no rack e este ficou inclinado por 5 min, para que o material Ag+Ac ficasse próximo à placa. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur descartável, a placa magnética removida e 1mL de Phosphate buffer saline com tween 20, pH 7,4 (PBS-T – Sigma Aldrich, Germany) adicionado. O rack foi submetido a movimentos suaves, para ressuspender as esferas, a placa magnética inserida e o mesmo procedimento retro descrito foi repetido duas vezes. Finalmente, as esferas foram ressuspensas em 100 μ L de PBS-T, semeados em duplicata, 50 μ L em cada placa contendo Ágar

McConkey Sorbitol (Oxoid, England) adicionado de 0,05mg/L de cefixima e 2,5mg/L de telurito de potássio (CT-SMAC). Após incubação à temperatura de 37°C por 18-20h., até 20 colônias sorbitol negativas, transparentes, de coloração palha, foram semeadas em Tryptic Soy Agar (TSA – Difco, France) e incubadas a 37°C, “overnight”. Após esse período, o crescimento foi coletado em, aproximadamente, 2mL de tampão fosfato salino, pH 7,4 (PBS-D), e 100µL foram então diluídos 10 vezes em água bidestilada ultra pura. O DNA alvo foi obtido pelo aquecimento da suspensão bacteriana diluída, por 10 min. em banho à temperatura de 100°C, e utilizado na PCR multiplex *rfb* O157 e *hly* A, descrita a seguir.

4.3.5. PCR multiplex *rfb* O157 e *hly*A

Colônias O157 isoladas por separação imunomagnética foram confirmadas através de PCR multiplex, descrita por PATON & PATON (1998), que permite também a classificação das cepas como produtoras ou não de enterohemolisina.

Foram utilizados os pares de primers O157 F e O157 R, HLY A F e HLY A R (BioSynthesis, USA).

O157 F – 5' CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG 3'

O157 R – 5' TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC 3'

HLY A F – 5' GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC 3'

HLY A R – 5' AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T 3'

A PCR foi realizada utilizando-se um mix que consistia de 2,0µL de tampão PCR 10x (Invitrogen, USA), 0,8µL de solução de MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen, USA), 0,4µL de dNTP a 2mM (Invitrogen, USA), 0,2µL (250 mM) de cada primer O157 e 0,3µL (250 mM) de cada primer HLY A, 0,2µL da Taq DNA polimerase (1U Invitrogen, USA), 10,6µL de água bidestilada ultra pura e 2µL do DNA molde, totalizando um volume final de 20µL. A amplificação foi realizada em termociclador, sob as seguintes condições: 10 ciclos a 95°C por 1', 65°C por 2', 72°C por 1'30", 15 ciclos a 95°C por 1', 60°C por 2', 72°C por 1'30", 10 ciclos a 95°C por 1', 60°C por 2', 72°C por 2'30". Foram incluídos controles em todas as reações: controle negativo sem DNA, *E. coli* Stx-negativo DH5α (K12), STEC Stx-positivo cepa E40705 (HLY A) e E30138 (O157). Os produtos

amplificados foram visualizados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1,0% corados com brometo de etídio. Foi utilizado como referência um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, USA).

4.3.6. Isolamento de *Escherichia coli* O113

As amostras O113 positivas estocadas a -20°C foram semeadas em Ágar MacConkey de modo a obter colônias isoladas típicas de *E. coli*, de coloração rósea, e incubadas à temperatura de 37°C por 18-20h. Até 120 colônias típicas de cada amostra foram semeadas em placas de TSA, 20 colônias por placa, e incubadas a 37°C, “overnight”. De cada amostra foram preparados 12 pools de 10 colônias, extraído o DNA e realizada a PCR *rfb* O113, descrita a seguir. Os pools positivos foram retestados a partir de colônias individuais, o que permitiu a identificação e isolamento das colônias positivas.

4.3.7. PCR *rfb* O113

Os pools de colônias O113 suspeitas e as colônias individuais foram submetidas a reação de PCR descrita por PATON & PATON (1999). Foi utilizado o par de primers O113 F e O113 R (BioSynthesis, USA).

O113 F – 5' AGC GTT TCT GAC ATA TGG AGTG 3'

O113 R – 5'GTG TTA GTA TCA AAA GAG GCT CC 3'

A PCR foi realizada utilizando-se um mix que consistia de 2,0µL de tampão PCR 10x (Invitrogen, USA), 0,8µL de solução de MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen, USA), 0,4µL de dNTP a 2mM (Invitrogen, USA), 0,1µL (250 mM) de cada primer O113, 0,2µL da Taq DNA polimerase (1U Invitrogen, USA), 13,4µL de água bidestilada ultra pura e 3µL do DNA molde, totalizando um volume final de 20µL. A amplificação foi realizada em termociclador, sob as seguintes condições: 10 ciclos a 95°C por 1', 65°C por 2', 72°C por 1'30", 15 ciclos a 95°C por 1', 60°C por 2', 72°C por 1'30", 10 ciclos a 95°C por 1', 60°C por 2', 72°C por 2'30". Foram incluídos controles em todas as reações: controle

negativo sem DNA, *E. coli* Stx-negativo DH5 α (K12) e *E. coli* O113:H21 (O113). Os produtos amplificados foram visualizados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1,0% corados com brometo de etídio. Foi utilizado como referência um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, USA).

4.3.8. Isolamento de *Escherichia coli* O111

4.3.8.1. Preparo das amostras

As amostras O111 positivas, a partir do estoque a -20°C, foram semeadas em TSB e incubadas a 37°C por 18-20h. Após esse período, com auxílio de uma alça de níquel cromo, uma alíquota da cultura foi inoculada em Buffer Pepton Water (BPW) e a mistura incubada a 42°C por 24h.

4.3.8.2. Separação Imunomagnética

A IMS foi realizada segundo a técnica descrita por SAFARIKOVA & SAFARIK (2001).

Foi retirado 1mL da cultura em BPW e transferido para eppendorff com 20 μ L de esferas magnéticas contendo anticorpos para o sorogrupo O111 – Dynabeads EPEC/VTEC O111 (Dynal, Norway). Os eppendorffs contendo a mistura foram dispostos em um rack apropriado e levados à incubação sob agitação contínua por 30 min. à temperatura ambiente. Uma placa magnética foi inserida no rack e este ficou inclinado por 5 min, para que o material Ag+Ac ficasse próximo à placa. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado, a placa magnética removida e 1mL de PBS-T adicionado. O rack foi movimentado para ressuspender as esferas, a placa magnética inserida e o mesmo procedimento retro descrito repetido duas vezes. Finalmente as esferas foram ressuspensas em 100 μ L de PBS-T, sendo 50 μ L semeados em placa contendo Blood Agar Base (Biolife, Itália), acrescido de sangue de ovino e 50 μ L semeados em Ágar McConkey (Oxoid, England) e incubados a 37°C por

18-24h. Após esse período, 10 colônias de cada meio de cultura foram semeadas em TSA e incubadas a 37°C, “overnigh”. De cada amostra foram preparados 2 pools de 10 colônias, extraído o DNA e realizada a PCR *rfb* O111, descrita a seguir. Os pools positivos foram retestados a partir de colônias individuais, o que permitiu a identificação e isolamento das colônias positivas.

4.3.9. PCR *rfb* O111

Os pools de colônias O111 suspeitas e as colônias individuais foram submetidas a reação de PCR descrita por PATON & PATON (1999). Foi utilizado o par de primers O113 F e O113 R (BioSynthesis, USA).

O113 F – 5' AGC GTT TCT GAC ATA TGG AGTG 3'

O113 R – 5'GTG TTA GTA TCA AAA GAG GCT CC 3'

A PCR foi realizada utilizando-se um mix que consistia de 2,0µL de tampão PCR 10x (Invitrogen, USA), 0,8µL de solução de MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen, USA), 0,4µL de dNTP a 2mM (Invitrogen, USA), 0,1µL (250 mM) de cada primer O113, 0,2µL da Taq DNA polimerase (1U Invitrogen, USA), 13,4µL de água bidestilada ultra pura e 3µL do DNA molde, totalizando um volume final de 20µL. A amplificação foi realizada em termociclador, sob as seguintes condições: 10 ciclos a 95°C por 1', 65°C por 2', 72°C por 1'30", 15 ciclos a 95°C por 1', 60°C por 2', 72°C por 1'30", 10 ciclos a 95°C por 1', 60°C por 2', 72°C por 2'30". Foram incluídos controles em todas as reações: controle negativo sem DNA, *E. coli* Stx-negativo DH5 α (K12) e *E. coli* O113:H21 (O113). Os produtos amplificados foram visualizados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1,0% corados com brometo de etídio. Foi utilizado como referência um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, USA).

5. RESULTADOS

Na Tabela 2 e na Figura 1 estão registradas as porcentagens de bovinos que apresentaram, em amostras de fezes, seqüências *stx* e *rfb* O113, O111 e O157. Dentre as 467 amostras de fezes analisadas, 337 (72,16%) foram STEC positivas e 144 (30,83%) foram O113 positivas. Também foram detectadas 69 (14,77%) amostras O157 positivas e uma amostra O111 positiva, o que equivale a 0,20%.

A Figura 2 apresenta o coeficiente de prevalência de *E. coli* shigatoxigênicas em amostras de fezes de bovinos leiteiros, de acordo com a faixa etária dos animais. Os coeficientes de prevalência em todas as faixas etárias estão na Tabela 3 e foram 58,88% para bezerros, 86,09% para novilhas e 68,89% para vacas.

A faixa etária que apresentou maior prevalência seqüência *rfb* O157 de *E. coli* em amostras de fezes foi a das novilhas (23,84%), conforme demonstrado na Figura 3 e Tabela 4. As taxas variaram de 13,08%, para bezerros a 9,09% para vacas.

A prevalência de seqüência *rfb* O111 de *E. coli* em amostras de fezes de gado leiteiro, de acordo com a faixa etária, está apresentada na Figura 4. Nota-se, observando a Tabela 5, que apenas um animal, sendo este um bezerro, apresentou seqüência *rfb* O111 no crescimento bacteriano de amostras de fezes.

Verifica-se, na Figura 5 e na Tabela 6, que as novilhas apresentaram a maior prevalência de seqüência *rfb* O113 de *E. coli* em amostras de fezes (33,77%). Para bezerros e vacas, as taxas variaram de 31,77% a 28,23%, respectivamente.

A Tabela 7 mostra a quantidade de amostras STEC, O157, O111 e O113 positivas, detectadas por PCR em fezes de bovinos com e sem diarreia. Nota-se que o número de amostras positivas foi mais elevado em animais que não apresentaram diarreia, entretanto, 11 (40,74%) das 27 amostras de animais com diarreia foram STEC positivas.

Observa-se, por meio da Tabela 8, que a categoria bezerros foi a que apresentou maior número de animais STEC, O157, O111 e O113 positivos com diarreia. Apenas uma vaca STEC positiva apresentou diarreia e nenhuma novilha positiva para qualquer um dos microrganismos pesquisados estava com diarreia.

O coeficiente de prevalência de seqüências *stx*₁, *stx*₂, *stx*₁/*stx*₂ de *Escherichia coli*

em amostras de fezes de bovinos STEC positivas e o coeficiente de prevalência de seqüência *eae* de *E. coli* em amostras de fezes de bovinos estão representadas na Figura 6. As seqüências mais encontradas foram *stx*₁/*stx*₂ (45,70%) e *stx*₂ (35,01%), seguidas por *eae* (32,76%) e *stx*₁ (19,28%).

As porcentagens de amostras de fezes de bovinos, positivas para *stx*, que apresentaram, seqüência *stx*₁ de *E. coli*, de acordo com a faixa etária estão apresentadas na Figura 7. Das amostras *stx* positivas, 19,28% foram seqüência *stx*₁, sendo que bezerros foi a categoria que apresentou maior porcentagem desta seqüência (36,50%). As novilhas e vacas apresentaram taxas de 14,61% e 15,97%, respectivamente.

Como se observa na Figura 8, as vacas apresentaram a maior prevalência de seqüência *stx*₂ das amostras *stx* positivas (36,80%), seguidos pelas novilhas (34,61%) e bezerros (31,75%).

De acordo com a Figura 9, as novilhas apresentaram a maior porcentagem de seqüência *stx*₁/*stx*₂ (51,53%). Para bezerros e vacas as taxas foram de 26,98% e 48,61%, respectivamente.

Pela Figura 10 pode-se observar o coeficiente de prevalência da seqüência *eae* de *E. coli* shigatoxigênica em amostras de fezes, de acordo com a faixa etária, sendo que foram *eae* positivas, 46,72% das amostras dos bezerros, 27,81% das novilhas e 29,18% das vacas.

Conforme demonstrado na Tabela 9 e Figura 11, seqüências *rfb* O113 foram detectadas em duas amostras de água (4,88%), sendo uma amostra de água de bebedouro animal e outra amostra de água utilizada no estábulo leiteiro. A seqüência *rfb* O157 foi detectada em uma amostra de água utilizada no estábulo leiteiro (2,44%). Foram detectadas oito seqüências *stx*, o que equivale a 19,51% das amostras pesquisadas. As seqüências *stx* foram encontradas em diversos tipos de amostras de água: fonte e bebedouro humano (*stx*₁/*stx*₂), poço e mina (*stx*₂), água utilizada no estábulo (*stx*₁), três amostras de bebedouro animal (duas *stx*₂ e uma *stx*₁).

De acordo com o ilustrado na Figura 12, as seqüências *rfb* O157 e O113 foram encontradas em 10% das amostras de leite, enquanto a seqüência *stx* foi encontrada em 33,33% das amostras de leite.

A Figura 13 representa as porcentagens de diferentes tipos de amostras de propriedades rurais, que apresentaram, no crescimento bacteriano seqüências *stx* de *Escherichia coli*. Constatou-se 19,51% das amostras de água com presença de seqüência *stx*. Um total de 33,33% das amostras de leite apresentou seqüências *stx* no crescimento bacteriano. As seqüências *eae* e *stx*₁ foram encontradas em uma amostra das mãos de ordenhador (3,57%). Duas amostras de teto apresentaram seqüências *stx*₂ e *stx*₁/*eae* (7,14%). Não foram encontradas seqüências *stx* nos seis bocais de ordenhadeira pesquisados.

Observa-se por meio da Tabela 10 os números e porcentagens de amostras de fezes, água e leite, *rfb* O157 positivas, detectadas por PCR, isoladas pela separação imunomagnética (IMS) e que apresentaram o gene *hly*. Das 69 amostras de fezes detectadas como O157 positivas pela reação em cadeia da polimerase, 37 cepas foram isoladas através da IMS, das quais 27 apresentaram o gene *hly* (enterohemolíticas). As amostras de água e leite detectadas por PCR não foram isoladas pela IMS.

Através da Tabela 11 nota-se que 25% das amostras detectadas por PCR como *rfb* O113 positivas foram isoladas. Não foram isoladas *E. coli* O113 das amostras de água PCR positivas e apenas uma STEC O113 foi isolada das três amostras de leite PCR positivas.

A Tabela 12 e Figura 14 mostram que dos dez rebanhos pesquisados neste estudo, 60% apresentaram seqüências *rfb* O157; 10%, seqüências *rfb* O111, 100%, seqüências *rfb* O113 e 100% seqüências *stx*.

TABELA 2 – Coeficientes de prevalência (CP) de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O113, O111 e O157 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

Seqüências <i>rfb</i> e <i>stx</i>	Amostras Positivas	Total	CP (%)
STEC	337	467	72,16
O157	69	467	14,77
O111	1	467	0,2
O113	144	467	30,83

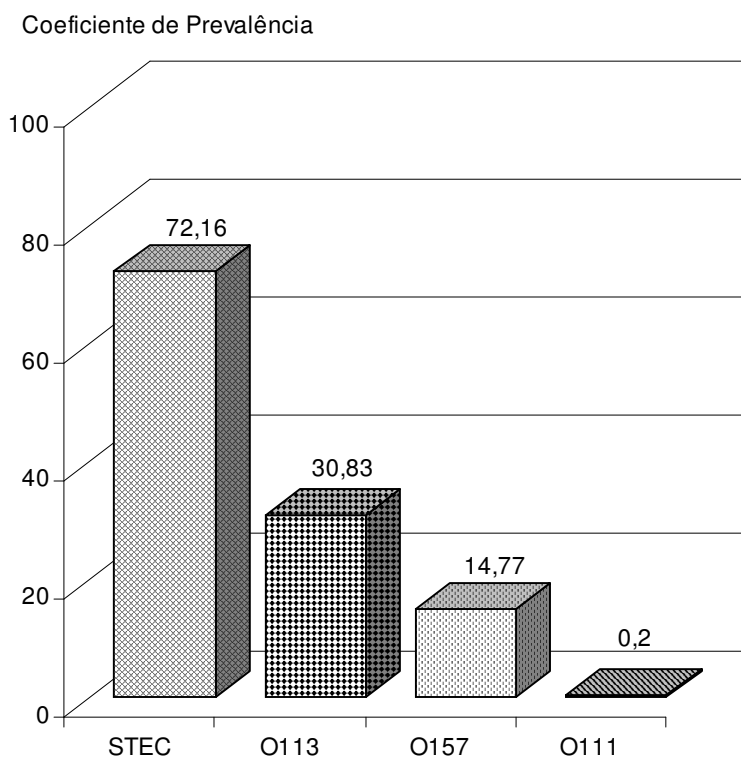


FIGURA 1 – Coeficientes de prevalência de seqüências *stx* e *rfb* O113, O111 e O157 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 3 – Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência *stx* de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.

Faixa etária	Amostras Positivas	Total	CP (%)
Bezerros	63	107	58,88
Novilhas	130	151	86,09
Vacas	144	209	68,89
Total	337	467	72,16

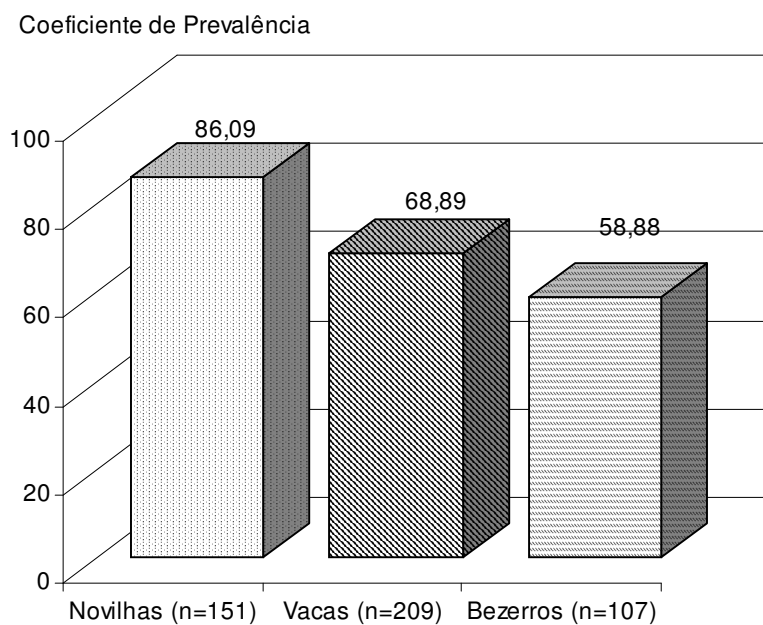


FIGURA 2 - Coeficientes de prevalência de seqüência *stx* de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 4 - Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência *rfb* O157 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.

Faixa etária	Amostras Positivas	Total	CP (%)
Bezerros	14	107	13,08
Novilhas	36	151	23,84
Vacas	19	209	9,09
Total	69	467	14,77

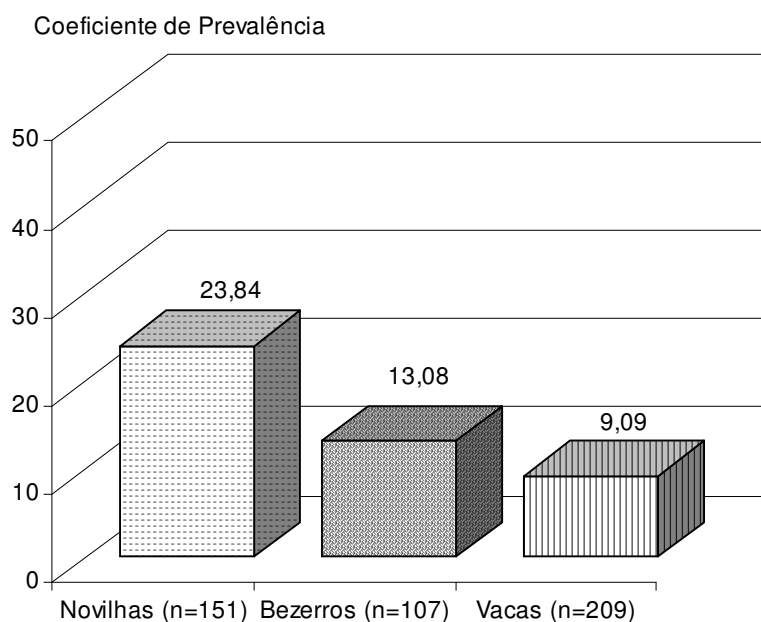


FIGURA 3 - Coeficientes de prevalência de seqüência *rfb* O157 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 5 - Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência *rfb* O111 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.

Faixa etária	Amostras Positivas	Total	CP (%)
Bezerros	1	107	0,9
Novilhas	0	151	0,0
Vacas	0	209	0,0
Total	1	467	0,2

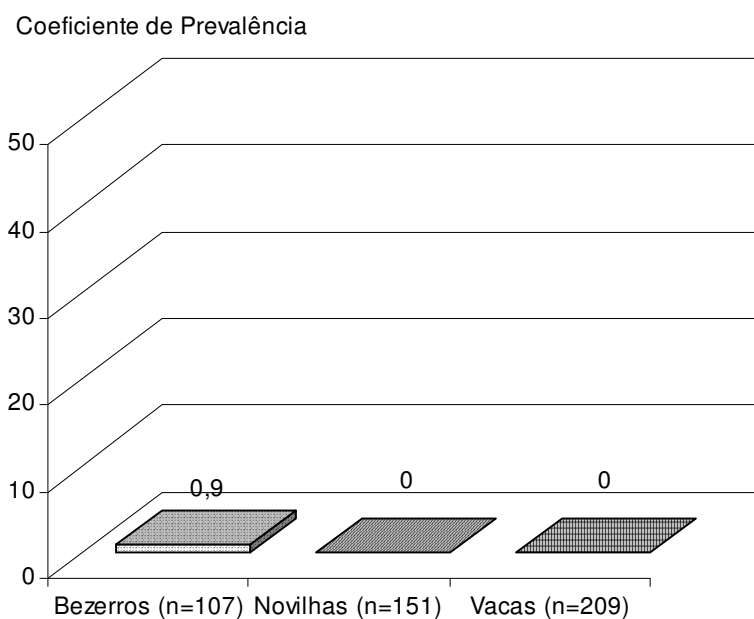


FIGURA 4 - Coeficientes de prevalência de seqüência *rfb* O111 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 6 - Coeficientes de prevalência (CP) de seqüência *rfb* O113 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.

Faixa etária	Positivos	Total	CP (%)
Bezerros	34	107	31,77
Novilhas	51	151	33,77
Vacas	59	209	28,23
Total	144	467	30,83

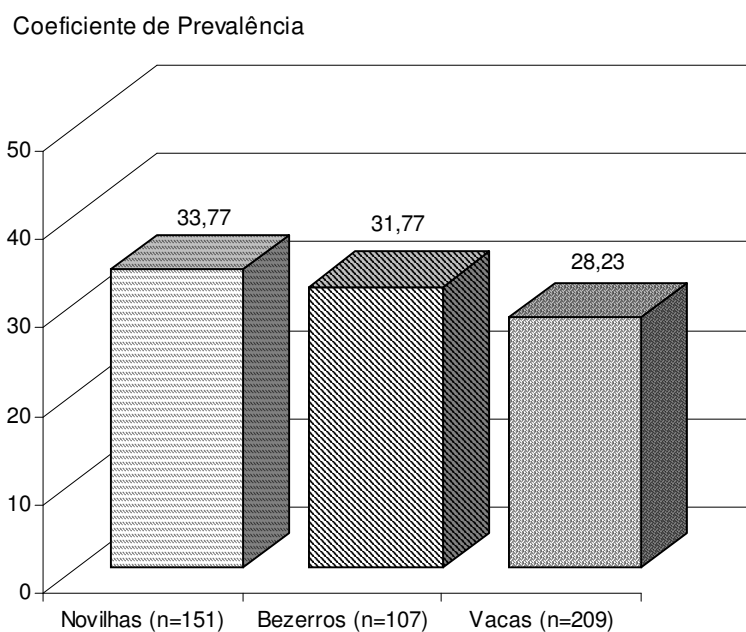


FIGURA 5 - Coeficientes de prevalência de seqüência *rfb* O113 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectada por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos bovinos. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 7 - Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal que não apresentaram seqüências *stx* (STEC-) e que apresentaram seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111, O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase, provenientes de bovinos com diarreia e sem diarreia. Jaboticabal-SP, 2003.

Seqüências <i>rfb</i> e <i>stx</i>	Bovinos com diarreia		Bovinos sem diarreia		Total
	Nº	%	Nº	%	
STEC-	16	12,30	114	87,69	130
STEC	11	3,26	326	96,70	337
O157	4	5,80	65	94,20	69
O111	1	100,00	0	0,00	1
O113	6	4,17	138	95,83	144

TABELA 8 - Número de amostras de fezes de bovinos com diarreia, do Município de Jaboticabal, que apresentaram -seqüências *stx* (STEC), *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal-SP, 2003.

Seqüências <i>rfb</i> e <i>stx</i>	Bezerros	Novilhas	Vacas	Total
STEC	10	0	1	11
O157	4	0	0	4
O111	1	0	0	1
O113	6	0	0	6

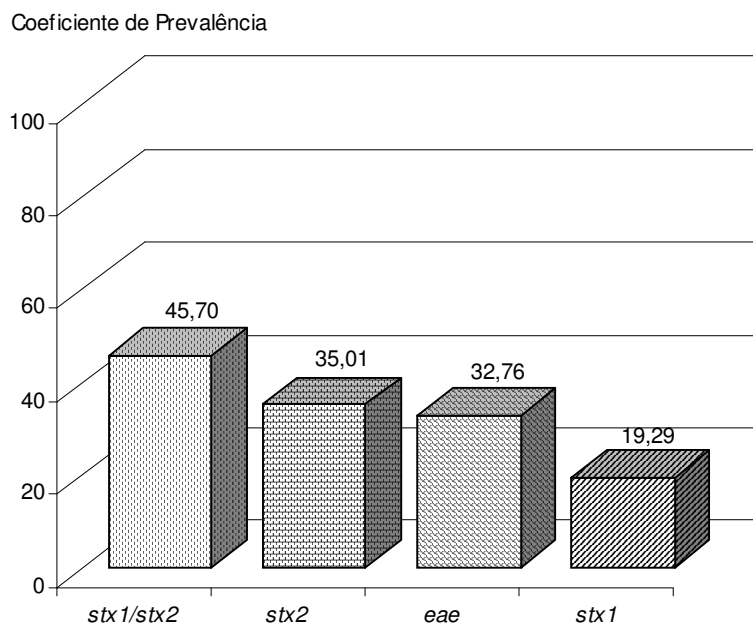


FIGURA 6 - Coeficiente de prevalência de seqüências *stx*₁, *stx*₂ e *stx*₁/*stx*₂ de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos STEC positivas e coeficiente de prevalência de seqüência *eae* de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos do Município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

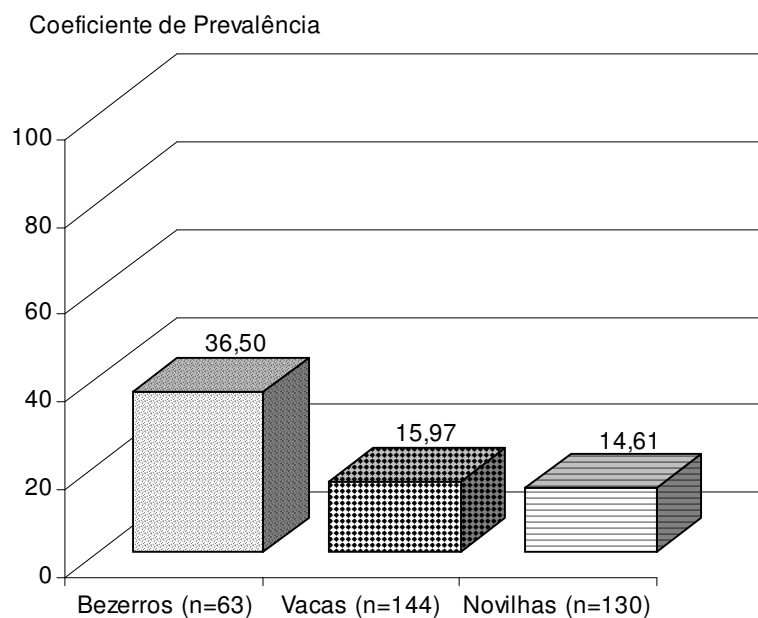


FIGURA 7 - Coeficiente de prevalência de seqüência *stx*₁ de *Escherichia coli* em amostras de fezes *stx* positivas, de bovinos de diferentes faixas etárias, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

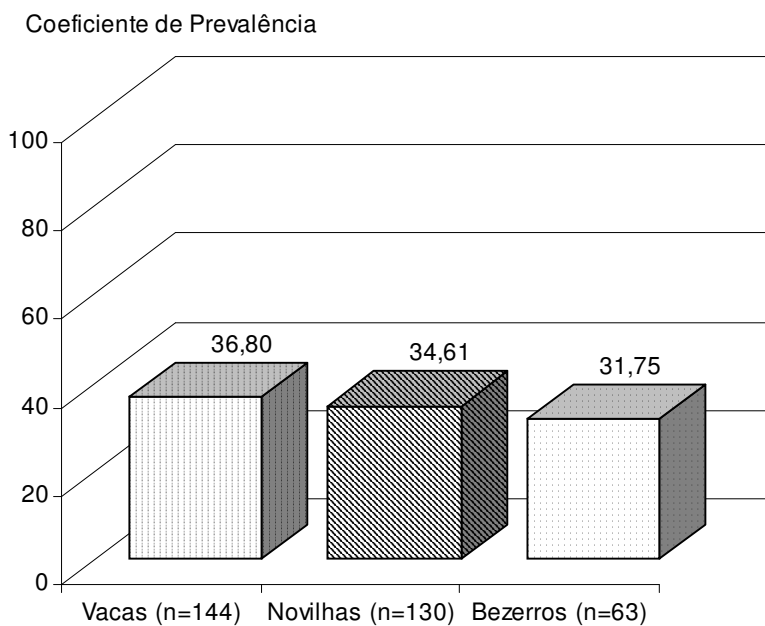


FIGURA 8 - Coeficiente de prevalência de seqüência *stx*₂ de *Escherichia coli* em amostras de fezes *stx* positivas, de bovinos de diferentes faixas etárias, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

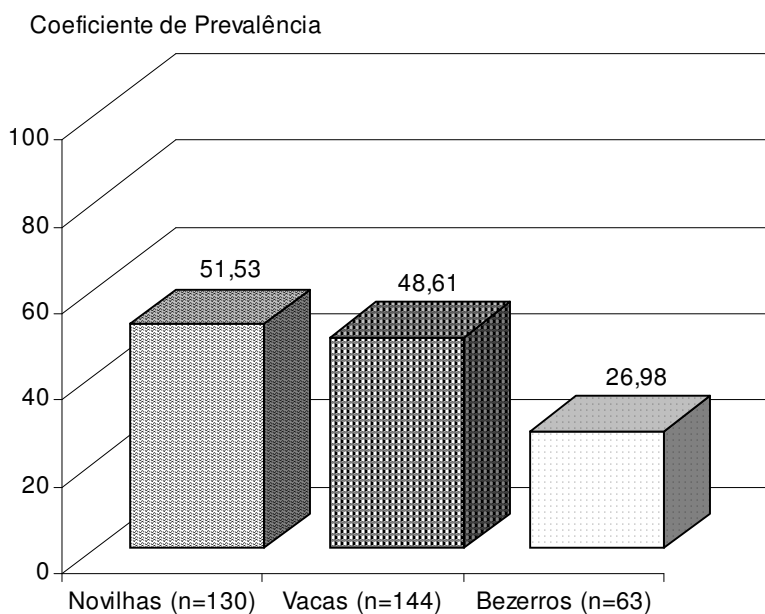


FIGURA 9 - Coeficiente de prevalência de seqüências *stx*₁/*stx*₂ de *Escherichia coli* em amostras de fezes *stx* positivas, de bovinos de diferentes faixas etárias, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

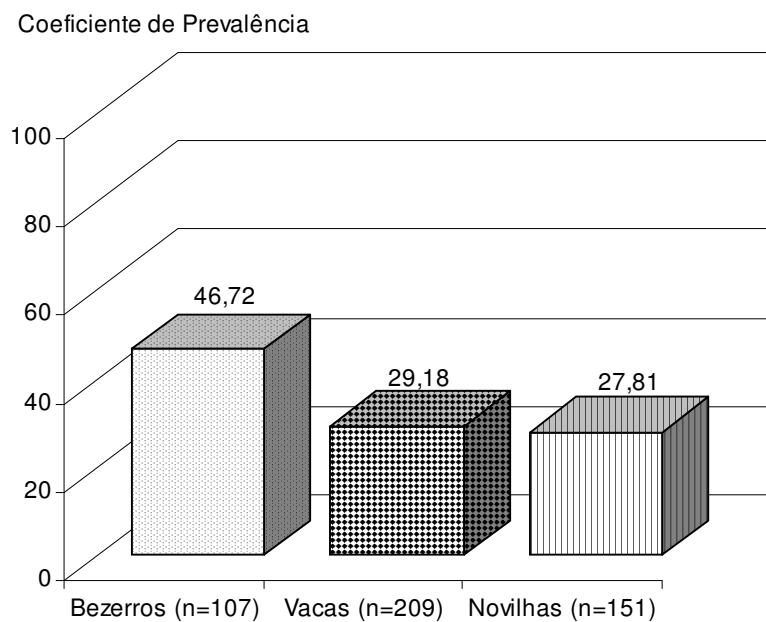


FIGURA 10 – Coeficiente de prevalência seqüência *eae* de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos, de diferentes faixas etárias, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 9 – Coeficiente de prevalência de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli* em amostras de água de propriedades rurais, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

Seqüências <i>rfb</i> e <i>stx</i>	Amostras Positivas	Total	CP (%)
STEC	8 ^a	41	19,51
O157	1 ^b	41	2,44
O111	0	41	0
O113	2 ^c	41	4,88

^aPoço profundo (2), mina (1), consumo humano (1), estábulo leiteiro (1), bebedouro animal (3).

^bEstábulo leiteiro.

^cEstábulo leiteiro (1), bebedouro animal (1).

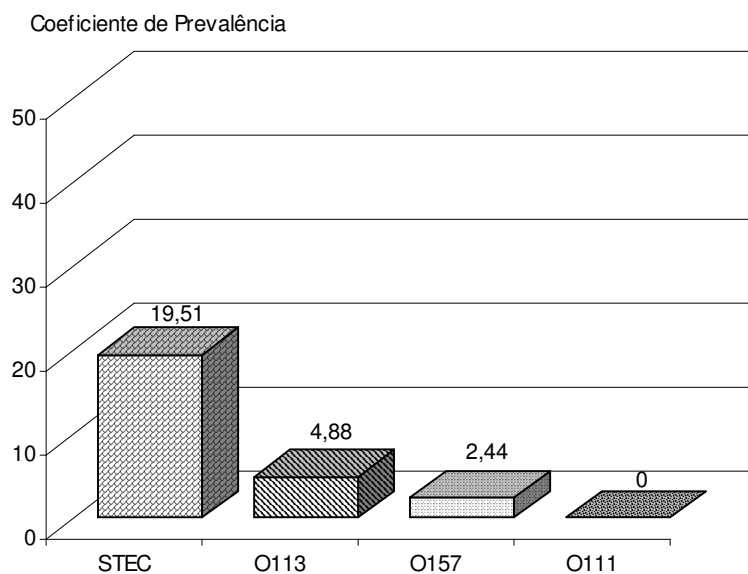


FIGURA 11 – Coeficiente de prevalência de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli* em amostras de água de propriedades rurais, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

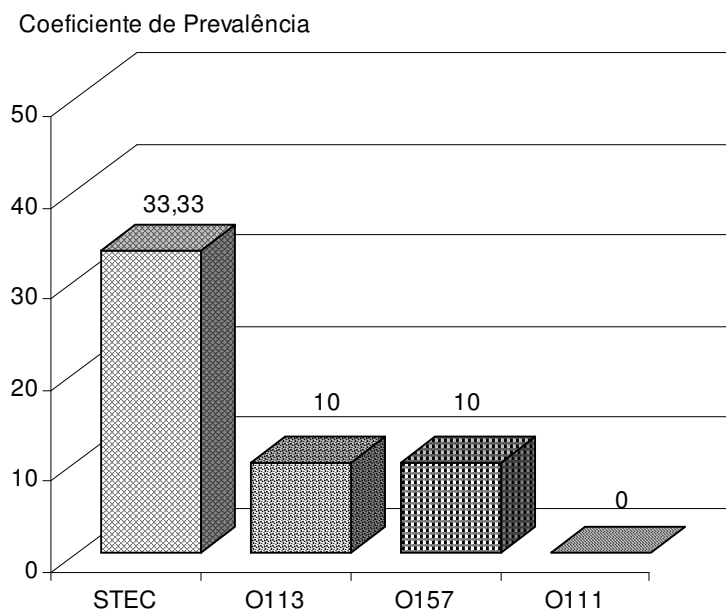


FIGURA 12 - Coeficiente de prevalência de seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli* em amostras de leite de propriedades rurais, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

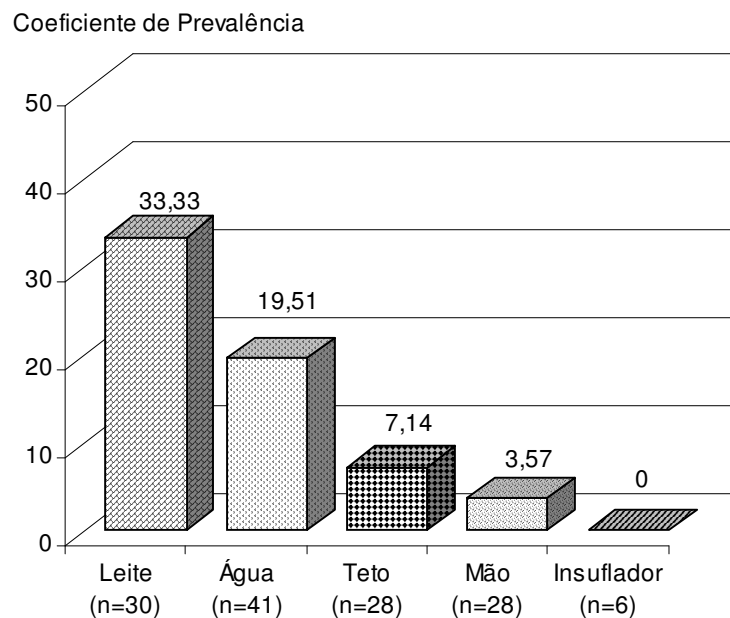


FIGURA 13 - Coeficiente de prevalência de seqüência *stx* de *Escherichia coli* em amostras de leite, água, teto de animais, mão de ordenhador e insuflador de ordenhadeira de propriedades rurais, detectada por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

TABELA 10 – Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos, água e leite de propriedades do Município de Jaboticabal, O157 positivas, detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR O157 positivas), isoladas por separação imunomagnética (IMS positivas), que apresentaram o gene *hly* (HLY positivas). Jaboticabal-SP, 2003.

Amostras	Total	PCR O157 positivas (%)	IMS positivas (%)	HLY positivas (%)
Fezes	467	69 (14,77)	37 (53,62)	27 (72,97)
Água	41	1 (2,44)	0 (0)	0 (0)
Leite	30	3 (10)	0 (0)	0 (0)

TABELA 11 - Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos, água e leite de propriedades do Município de Jaboticabal O113 positivas, detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR O113 positivas) e isoladas (Isoladas). Jaboticabal-SP, 2003.

Amostras	Total	PCR O113 positivas (%)	Isoladas (%)
Fezes	467	144 (30,83)	36 (25)
Água	41	2 (4,88)	0 (0)
Leite	30	3 (10)	1 (33,33)

TABELA 12 - Número e porcentagem de rebanhos, que apresentaram, no crescimento bacteriano de amostras de fezes de bovinos, seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

Seqüências <i>rfb</i> e <i>stx</i>	Positivos	Negativos	CP* (%)
STEC	10	0	100
O157	6	4	60
O111	1	9	10
O113	10	0	100

* - Coeficiente de Prevalência

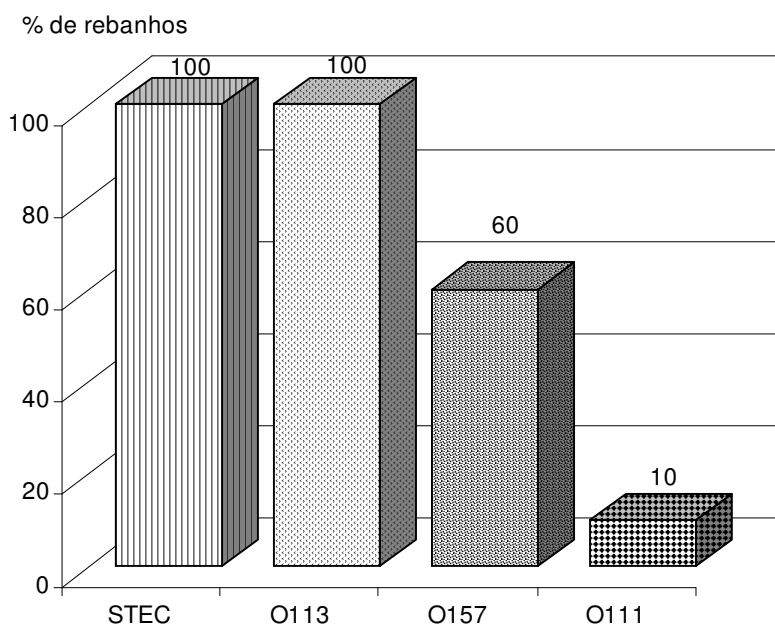


FIGURA 14 - Porcentagens de rebanhos, que apresentaram, no crescimento bacteriano de amostras de fezes de bovinos, seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia da polimerase. Jaboticabal-SP, 2003.

6. DISCUSSÃO

Escherichia coli shigatoxigênicas (STEC) são importantes causa de doença gastrointestinal em seres humanos, particularmente porque podem resultar em casos fatais de síndrome hemolítica urêmica (SHU). BANATVALA et al. (2001) realizando um estudo prospectivo dos casos de SHU nos EUA, concluíram que 72% dos casos no país eram devidos a STEC.

A maioria dos casos de SHU têm sido relatada em países desenvolvidos. Na América do Sul a SHU é a principal causa de falência renal aguda em crianças, na Argentina (RIVAS et al., 1998) e no Chile (CORDOVEZ et al., 1992). Embora no Brasil as infecções por STEC estejam relacionadas a casos esporádicos de diarreia (IRINO et al., 2002), em 2001 foi relatado em uma criança de oito meses, o primeiro caso de SHU devido a STEC (GUTH et al., 2002a).

No presente estudo, uma alta prevalência (72,16%) de seqüências *stx* (Figura 1) foi detectada nas fezes de bovinos pertencentes a rebanhos leiteiros do município de Jaboticabal-SP, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma vez que, uma reação positiva com primers específicos para *stx*₁ e *stx*₂ é suficiente para confirmar a presença de STEC na amostra (PATON & PATON, 2005), pode-se concluir que 72,16% das amostras de fezes analisadas apresentaram STEC.

Os dados sobre prevalência de STEC em propriedades leiteiras encontrados na literatura apresentam uma grande variação. No Canadá, uma pesquisa realizada com gado leiteiro, em 1992, mostrou uma taxa de prevalência de 45,0% (JOHNSON et al., 1996). BUSATO et al. (1999) na Suíça, detectaram STEC em 44,3% dos animais de propriedades leiteiras. Na Alemanha, 21,0% dos animais provenientes de rebanhos sadios eram portadores de cepas de STEC (MONTENEGRO et al., 1990, BEUTIN et al., 1993). Na Argentina, SANZ et al. (1998), relataram uma prevalência desse agente de 44,0%, em vacas. Nos EUA, WELLS et al. (1991) detectaram STEC em 19,0% dos bezerros e 8,0% de vacas adultas, em propriedades leiteiras. No Brasil, foram descritas prevalências de 82% no Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1999) e 49% no Rio Grande do Sul (MOREIRA et al., 2003).

STEC associadas a doenças em seres humanos têm sido isoladas de diversos

alimentos e principalmente carne bovina, nos EUA, entretanto, acredita-se que possa haver mais casos que os relatados, já que o diagnóstico e os procedimentos de vigilância tendem a buscar somente o sorotipo O157:H7 (COBBOLD et al., 2004).

CERQUEIRA et al. (1997), pesquisando a ocorrência de *E. coli* causadoras de diarreia em produtos crus de origem bovina, na cidade do Rio de Janeiro, verificaram ocorrência de 59% de STEC, sendo que a maioria das cepas foi isolada de amostras de carne bovina e hambúrguer crus.

A alta prevalência de STEC encontrada no rebanho leiteiro de Jaboticabal pode causar um impacto direto na segurança alimentar, uma vez que uma porção significativa da carne bovina, é proveniente de rebanho leiteiro (NATIONAL CATTLEMEN'S BEEF ASSOCIATION, 2001).

Mais que 80% dos casos de SHU por STEC são devidos à infecção por *E. coli* O157, este mesmo sorogrupo é o responsável pela maioria dos casos de SHU pós-diarreia entre adultos e crianças (BANATVALA et al., 2001).

O coeficiente de prevalência do sorogrupo O157, de 14,77%, encontrado nas fezes dos animais (Figura 1), é bem mais elevado que os resultados apresentados por HANCOCK et al. (1997) e VOLD et al. (1998), os quais obtiveram prevalências de 1,0%. CHAPMAN et al. (1993) isolaram *E. coli* O157 de 4% das amostras de fezes de bovinos antes do abate, destes animais O157 positivos nas fezes, 30% também apresentaram o sorogrupo O157 na carcaça após o abate, além disso, 8% dos bovinos O157 negativos nas fezes apresentaram contaminação por O157 na carcaça. Isto indica que os bovinos são um reservatório de *E. coli* O157 e que a contaminação da carcaça durante o abate ou processamento pode ser o meio pelo qual a carne e seus subprodutos se contaminem e então, transmitam o microrganismo ao homem. Carnes, provenientes não só do gado de corte, como também do gado leiteiro, têm sido associadas a surtos causados por *E. coli* O157:H7 (GRIFFIN & TAUXE, 1991).

A infecção por *E. coli* O157:H7 em populações de adultos jovens e de meia idade, algumas vezes, não é diagnosticada porque a doença é geralmente branda ou assintomática neste grupo de pessoas. Embora os pacientes com diarreia não sanguinolenta desenvolvam um quadro clínico benigno da doença, a detecção da infecção é importante porque a *E. coli* O157:H7 pode ser transmitida de pessoa a

pessoa e provocar complicações severas em indivíduos infectados secundariamente. O processamento de rotina de amostras de fezes na maioria dos laboratórios clínicos não inclui a cultura em ágar sorbitol MacConkey, portanto, muitas pessoas de quem têm sido colhidas amostras de fezes terão o diagnóstico incorreto (RODRIGUE et al., 1995).

Estimar a prevalência de infecção por *E. coli* O157 no Brasil, é difícil, pois são poucos os laboratórios microbiológicos que realizam testes para detectar esta bactéria. As três cepas de *E. coli* O157:H7, até o presente momento, associadas a doença em humanos foram isoladas em São Paulo, de um paciente HIV positivo, em 1990 (VAZ et al., 2004), de uma garota de quatro anos com diarreia hemorrágica e de um adulto com diarreia intensa (IRINO et al., 2002). A implementação de um sistema de vigilância de diarreia hemorrágica e SHU, no Brasil, poderá contribuir na estimativa da real associação existente entre cepas de *E. coli* O157:H7 e outras STEC que não a O157, com infecções em seres humanos (VAZ et al., 2004).

Os surtos com EHEC têm acontecido na maioria das vezes em países industrializados, entretanto seria apropriado avaliar com que frequência estes patógenos podem causar diarreia endêmica em crianças e adultos de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (LEVINE et al., 1987). Determinar a participação do sorogrupo O157 em casos de disenteria é mais que uma preocupação acadêmica uma vez que os protocolos no tratamento sintomático em áreas em que o agente etiológico não pode ser prontamente identificado, geralmente inclui o tratamento empírico com antibióticos (EFFLER et al., 2001). Dados recentes sugerem que tratar a infecção por *E. coli* O157 com antibióticos pode predispor o paciente ao desenvolvimento de complicações, entre elas a SHU (MEAD & GRIFFIN, 1998, WONG et al., 2000).

Devido às características patogênicas da *E. coli* O157, é importante que sua prevalência em produtos alimentícios seja a mais baixa possível (TUTENEL et al., 2002). Até que sejam tomadas medidas para melhorar a qualidade microbiológica e segurança da carne, pessoas que pertencem aos grupos de risco para desenvolver complicações, como crianças menores que cinco anos, idosos e imunossuprimidos, deveriam consumir somente carne bovina bem cozida. Além disso, aqueles que manipulam a carne deveriam ter certeza de que todos os equipamentos e superfícies

que entram em contato com ela são adequadamente higienizados e sanitizados antes de serem utilizados em alimentos que não serão cozidos (RODRIGUE et al., 1995).

STEC pertencentes ao sorogrupo O111 também têm sido encontradas em fezes de bovinos (BETTELHEIM, 2003). WELLS et al. (1991), KOBAYASHI et al. (2001) e ORDEN et al. (2002) relataram as seguintes prevalências, respectivamente, 0,32%, 0,56% e 1,21%.

Somente 0,2% dos animais foram positivos para o *rfb* O111 (Figura 1). Embora este coeficiente de prevalência tenha sido, relativamente, baixo, VICENTE et al. (2005) encontraram uma prevalência de 3,3%, dois anos antes, em trabalho realizado nas mesmas propriedades, durante o período chuvoso, ademais deve-se lembrar que a *E. coli* O111 é um dos sorogrupos de STEC mais importante. A maioria dos surtos em seres humanos causados por outras STEC sem ser a O157 são atribuídos a cepas pertencentes a esse sorogrupo (BETTELHEIM, 2003). Nos EUA, a cada sete surtos por STEC que não a O157, três são causados por *E. coli* O111. De 940 isolados de STEC que não pertenciam ao sorogrupo O157, provenientes de fezes de humanos, identificados pelo laboratório de referência do CDC de 1983 a 2002, 16% das cepas eram do sorogrupo O111, ficando atrás apenas da *E. coli* O26, encontrada em 22% dos isolados (BROOKS et al., 2005).

Este sorogrupo é causa reconhecida de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (BANATVALA et al., 2001, TOZZI, et al., 2003). Surtos relacionados a *E. coli* O111 têm sido descritos no Canadá (KARMALI et al., 1994), Austrália (HENNING et al., 1998), Japão (TANAKA et al., 1989), Itália (CAPRIOLI et al., 1994), Estados Unidos (CDC, 2000a), Finlândia (EKLUND et al., 2001), França e Alemanha (MORABITO et al., 1999).

A transmissão de STEC O111 através de alimentos foi comprovada em apenas um surto, devido ao consumo de lingüiça bovina, na Austrália, resultando na hospitalização de 20 crianças e na morte de uma delas (HENNING et al., 1998). Surtos de infecção por *E. coli* O111 também resultam do contato entre pessoas (CARLSON, 2002) e possivelmente da exposição à água contaminada (BLANCO et al., 1996a). Em um surto ocorrido no Texas, entre adolescentes em um acampamento, devido à ingestão de salada com *E. coli* O111, é possível que o campo ou a água de irrigação

contendo fezes tenham resultado na contaminação dos constituintes da salada consumida pelos jovens afetados (BROOKS et al., 2004).

STEC foram identificadas em 29 (1,1%) cepas de uma coleção de 2.607 *E. coli* do Instituto Adolfo Lutz, isoladas de pacientes com diarreia, em São Paulo, de 1976 a 1999. A maioria das cepas foi isolada de crianças até cinco anos, mas duas foram isoladas de adultos. As cepas de STEC pertenciam em sua maioria aos sorotipos O111:HNM e O111:H8 (VAZ et al., 2004). Uma baixa ocorrência de STEC O111 em São Paulo foi relatada anteriormente (GUTH et al., 2002b). Embora surtos de SHU causados por cepas de O111 tenham sido relatados em outros países, as cepas isoladas em São Paulo foram associadas a casos esporádicos de diarreia em crianças. No entanto, considerando este sorogrupo e os perfis de virulência encontrados nas cepas isoladas, estas STEC podem ser classificadas como EHEC e não seria de surpreender se alguma delas tivesse sido associada a uma doença mais grave (VAZ et al., 2004).

A magnitude do problema de saúde pública causado pela *E. coli* O111 e outras STEC sem ser a O157 são apenas superficialmente estimados uma vez que a maioria dos laboratórios não faz testes em amostras de fezes para estes patógenos (SCHMIDT & KARCH, 1996).

Cepas de STEC que possuem a sequência *eae* são consideradas mais virulentas para humanos que aquelas que não possuem (BARRET et al., 1992). Entretanto, as *E. coli* O113, mesmo sem a sequência *eae*, são capazes de colonizar o trato gastrointestinal humano e provocar a síndrome hemolítica urêmica (PATON et al., 1999). O113 foi um dos primeiros sorogrupos de STEC a ser associado à SHU; segundo KARMALI et al. (1985), duas a cada 12 cepas de STEC isoladas de pacientes com SHU são de *E. coli* O113. Em 1999, PATON & PATON declararam que no sul da Austrália, nos últimos cinco anos, O113 tinha sido o terceiro sorogrupo mais prevalente entre as STEC associadas a casos de SHU.

Particularmente, o sorotipo O113:H21 têm sido isolado de fezes de crianças com CH e SHU. *E. coli* O113 já foi isolada de alimentos como, carne moída, carne bovina, lingüiça e leite (WHO, 1998), incluindo hambúrguer congelado comercializado na cidade do Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1997).

ARTHUR et al. (2002) encontraram 12 (3,59%) amostras de carcaça bovina, antes da evisceração, contaminadas por *E. coli* O113; após o processamento e a higienização, apenas 3 (0,92%) carcaças continuaram apresentando STEC O113. ELDER et al. (2000) e BARKOCY-GALLAGHER et al. (2001), demonstraram que o couro e as fezes de animais destinados ao abate são as principais fontes de patógenos durante o processamento da carne.

STEC O113 prevalentes no rebanho bovino apresentam grandes chances de entrar na cadeia de alimentação humana (PATON & PATON, 1999), por este motivo o alto coeficiente de prevalência de seqüências *rfb* de *E. coli* O113 (30,83%) encontrado nos bovinos neste trabalho (Figura 1), serve como um alerta para que medidas sejam tomadas a fim de diminuir o risco de contaminação ambiental por esses microrganismos e de transmissão ao ser humano.

Ainda não está claro que proporção de STEC detectadas nas fezes de bovinos ou em carcaças é capaz de causar doença em seres humanos. Contudo, GYLES et al. (1998) defende a idéia de que todas as STEC podem ser patogênicas em condições adequadas. Isto significa que cepas menos virulentas podem causar o mesmo tipo de doença que cepas mais virulentas, desde que haja uma dose suficientemente alta e imunidade suficientemente baixa do indivíduo infectado. Certamente existem STEC não patogênicas, entretanto cada cepa de STEC deveria ser considerada uma potencial *E. coli* enterohemorrágica (BÜRK et al., 2002).

Em acordo com a maioria dos trabalhos publicados até o momento, a maior prevalência de STEC foi observada entre novilhas (86,09%), entretanto, a segunda maior prevalência foi encontrada em animais adultos (68,89%) e a menor em bezerros (58,88%), com diferença significativa ao nível de 5%, contrariando resultados anteriores que descrevem novilhas e bezerros com prevalência maior que vacas (Tabela 3 e Figura 2). Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por MOREIRA et al., (2003), no Brasil e por KOBAYASHI et al., (2001) no Japão, estes também relataram maior prevalência entre novilhas e vacas.

Observou-se um coeficiente de prevalência de seqüências *rfb* O157 e O111 significativamente maior, entre bezerros e novilhas, ao nível de 5%. Os coeficientes de prevalência de seqüência *rfb* O113 não apresentaram diferença significativa entre as

categorias animais, ao nível de 5% (Tabelas 4, 5, 6 e Figuras 3, 4 e 5). Estes resultados são concordantes aos descritos por WELLS et al. (1991) e RAHN et al. (1997). As razões para essas diferenças de prevalência entre faixas etárias, ainda são desconhecidas, mas podem refletir diferenças no desenvolvimento ruminal, dieta, resistência a infecções e outros fatores (WELLS et al. 1991). Porém, uma vez que a maioria dos produtos cárneos e os lácteos são provenientes de animais adultos, o controle da infecção por STEC é necessário em todas as categorias animais (CRAY JR & MOON, 1995).

Analisando a Tabela 7 é possível verificar que, com exceção do sorogrupo O111, todas as outras STEC foram detectadas com maior frequência em fezes de bovinos sem diarreia. Vários autores sugerem que esses microrganismos podem fazer parte da microbiota normal de bovinos, uma vez que são isolados com maior frequência de animais saudáveis do que de animais com diarreia (BLANCO et al., 1993; BLANCO et al., 1996b; WIELER et al., 1996). Em infecção experimental de bezerros e animais adultos com *Escherichia coli* O157:H7, realizada por CRAY JR & MOON (1995), todos os adultos e a maioria dos bezerros infectados permaneceram clinicamente normais. Esta característica torna o controle da disseminação entre os bovinos difícil, porque os animais infectados não são clinicamente identificáveis (GARBER et al., 1995), facilitando que os portadores contaminem, por meio de suas fezes, o solo, a água, o cocho, equipamentos de ordenha, o ambiente de maneira geral, os quais são importantes vias de transmissão do microrganismo, tanto para o ser humano como para os animais.

Dos bovinos com diarreia que apresentaram STEC nas fezes, a maioria foram bezerros (Tabela 8). Cepas de *E. coli* O113, O157, O111 e outras STEC já foram isoladas de fezes de animais com diarreia, sempre em baixa proporção (BETTELHEIM, 2003, BLANCO et al., 1988, ORSKOV et al., 1987). Algumas STEC podem causar doenças como diarreia ou disenteria em bezerros. As STEC relacionadas a doenças em bovinos pertencem a um limitado número de sorotipos, alguns dos quais são patogênicos para seres humanos. Dentre esses, está o sorogrupo O111 (WHO, 1998), único, neste trabalho, prevalente em apenas um bezerro com diarreia.

SCHOONDERWOERD et al. (1988) também relataram STEC O111 como causa de diarreia em bezerros.

Não se sabe porque alguns sorotipos de STEC podem causar doença em seres humanos, mas não em bovinos. STEC isoladas de bovinos saudáveis geralmente possuem a mesma combinação de genes de virulência encontrada em isolados de humanos (SANDHU et al., 1996, WIELER et al., 1996, KOBAYASHI et al., 2001). Entretanto, diferenças na expressão desses genes têm sido detectadas entre os isolados de humanos e bovinos “in vitro”, e talvez isso possa afetar o potencial da transmissão zoonótica (MCNALLY et al., 2001).

O conjunto de fatores de virulência necessários para causar doença relacionada à EHEC ainda não está bem definido. Têm sido feitas associações entre a presença de determinados genes e a habilidade das STEC de causar agravos à saúde de seres humanos. O estudo do perfil das toxinas de *E. coli* O157:H7 provenientes de isolados clínicos realizados por OSTROFF et al. (1989b) mostrou que pacientes infectados com cepas portadoras do gene *stx*₂ eram 6,8 vezes mais suscetíveis ao desenvolvimento de doença grave do que aqueles infectados com cepas portadoras de *stx*₁ ou *stx*₁/*stx*₂. Outro estudo determinou que Stx2 têm uma dose letal 50% menor que a Stx1 quando administradas a camundongos (BOERLIN et al., 1999). Por outro lado, o perfil toxigênico de cepas de EHEC isoladas de pacientes chilenos com SHU ou diarreia aguda mostrou que o genótipo predominante foi *stx*₁/*stx*₂ ou apenas *stx*₁ (CORDOVEZ et al., 1992, PRADO et al., 1995), em concordância com o perfil genético predominante em EHEC isoladas de pacientes com SHU descrito por RIOS et al. (1999).

Embora, o papel de cada Stx na patogênese das infecções causadas por cepas de EHEC e mais especificamente, no desenvolvimento da SHU, permaneça controverso (RIOS et al., 1999), a maioria dos autores relata que a produção de Stx2 está associada a maior risco de desenvolver SHU (OSTROFF et al., 1989b, KLEANTHOUS et al., 1990, BOERLIN et al., 1999). Além disso, as cepas de STEC que apresentam a sequência *eae* são mais virulentas para seres humanos (BARRET et al., 1992, WILLSHAW et al., 1994).

Logo, torna-se de grande importância o resultado obtido nesta pesquisa, na qual sequências *stx*₁/*stx*₂, *stx*₂ e *eae* apresentaram os maiores coeficientes de prevalência

entre as amostras de fezes, respectivamente, 45,70%, 35,01% e 32,76% (Figura 6), o que foi descrito, também, por BLANCO et al. (1997), MIYAO et al. (1998), SANZ et al. (1998), VOLD et al. (1998) e CERQUEIRA et al. (1999). Segundo BLANCO et al. (1993) as STEC que produzem *Stx*₂ fazem parte do grupo bacteriano que compõe a microbiota intestinal normal do rebanho, talvez por este motivo a seqüência *stx*₂ tenha sido encontrada com maior freqüência. Ademais, as seqüências *stx*₁ e *stx*₂ estão localizadas em elementos genéticos móveis e podem apresentar diferentes padrões de mobilidade, portanto, talvez ocorra a transferência da seqüência *stx*₂ de sorotipos não patogênicos para patogênicos com maior freqüência (VOLD et al. 1998).

Talvez existam fatores específicos em cada categoria animal, bezerros, novilhas e vaca, que influenciem a mobilidade de tais seqüências, o que explicaria a variabilidade de prevalências encontradas por faixa etária para as seqüências *stx*₁, *stx*₂ e *stx*₁/*stx*₂, descritas nas Figuras 7, 8 e 9.

Os resultados deste trabalho relativos à prevalência da seqüência *eae*, em que foram encontrados os seguintes valores, por faixa etária, 46,72% para bezerros, 27,81% para novilhas e 29,18% para vacas (Figura 10), são muito semelhantes aos obtidos por SANDHU et al. (1996), que também demonstraram que o gene *eae* é mais comumente encontrado em STEC de bezerros que de vacas (42% vs. 18%).

Sabe-se que a água é um importante meio de disseminação de STEC entre os animais e os seres humanos. Uma criança de um ano e 4 meses de idade, hospitalizada devido a diarreia sanguinolenta e cólicas abdominais por *Escherichia coli* O157:H7, infectou-se através da água contaminada, proveniente de um poço profundo de uma propriedade rural leiteira (JACKSON et al., 1998). A contaminação da água também deve ter aumentado a exposição do rebanho que, segundo VOLD et al., (1998), apresentou níveis de animais infectados (68%) bem acima daqueles normalmente encontrados (0,28 a 1,8%). A circulação do microrganismo entre o gado e o suprimento de água serviria como uma contínua fonte de exposição para a família residente na propriedade rural e para o rebanho.

Observa-se na Tabela 9 que duas amostras de água provenientes de poço profundo e uma de consumo humano apresentaram seqüências *stx*. Apesar de se encontrarem no subsolo, e por isso teoricamente mais protegidas da contaminação,

águas subterrâneas, segundo LACK (1999) citado por AMARAL (2001), foram responsáveis por 56% dos surtos de veiculação hídrica, em 18 países da Europa, de 1986 a 1996. No Estado de São Paulo, a primeira cepa de *E. coli* O157:H7 toxigênica, foi isolada e identificada pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), em julho de 1997. Essa cepa foi isolada a partir de uma amostra de água de poço, enviada para análise pelo caseiro de uma chácara localizada em Parelheiros, subdistrito do município de São Paulo. Uma vez detectado este agente de grande importância em Saúde Pública, foi desenvolvido um trabalho interinstitucional envolvendo o IAL (Divisão de Bromatologia e Química e Divisão de Biologia Médica), o Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica), o Centro de Vigilância Sanitária e as Vigilâncias Epidemiológica e Sanitária da Direção Regional de Saúde I, do Estado de São Paulo (KATSUYA et al., 1998). A água consumida no meio rural, na maioria oriunda de lençóis subterrâneos e ingerida sem tratamento, representa risco à saúde do consumidor, por este motivo a preservação e manutenção de sua qualidade é de suma importância sob o aspecto de Saúde Pública (AMARAL, 2001).

Em janeiro de 1990 houve um surto de origem hídrica, associado a *E. coli* O157:H7 em Missouri (EUA), em que foram constatados 243 casos de diarreia, sendo que 86 dos pacientes apresentaram diarreia sanguinolenta, 32 pessoas foram hospitalizadas, quatro morreram e duas desenvolveram SHU. Entre 20 e 10 dias antes do surto, 45 metros da tubulação de água tiveram que ser trocados e dois dos canos principais tinham quebrado, acredita-se que a água tenha sido contaminada pelo esgoto. O número de casos diminuiu rapidamente depois que os moradores foram instruídos a ferver a água e depois que o suprimento de água foi clorado (SWERDLOW et al., 1992).

Foi relatado em 1992 o primeiro grande surto de infecção por *E. coli* O157 em países em desenvolvimento. O surto envolveu dois países vizinhos, África do Sul e Swaziland. Durante o período da seca, o gado portador de *E. coli* O157 costumava pastar nos leitos vazios dos rios, onde vários animais defecavam e alguns morriam, com o início do período chuvoso a água contaminada com as fezes do gado chegou até os vilarejos ribeirinhos possibilitando a infecção dos moradores da região (EFFLER et al., 2001).

Em propriedades leiteiras deve-se dar importância à qualidade da água a ser utilizada na dessedentação dos animais, pois, ela pode atuar como um importante veículo na disseminação de agentes patógenos entre o rebanho. Neste trabalho, foram encontradas seqüências *stx* em três amostras de água provenientes de bebedouros animais e uma seqüência *rfb* O113, também em bebedouro animal (Tabela 9). SHERE et al. (1998) afirmaram que a alta incidência de *E. coli* O157:H7 encontrada nos bebedouros animais de determinada fazenda, pôde explicar o maior número de animais positivos para este sorotipo na propriedade rural. Os resultados obtidos por FAITH et al. (1996) em estudo de prevalência, também indicaram que a *Escherichia coli* O157:H7 pode ser disseminada ou mantida dentro de um rebanho por meio da água de dessedentação contaminada. Portanto, faz-se necessária a desinfecção da água oferecida aos animais, bem como o controle periódico da qualidade microbiológica deste importante nutriente, uma vez que devemos ter como objetivo, oferecer aos bovinos uma água considerada potável.

A Tabela 9 ainda mostra que foram detectadas, em amostras de água provenientes dos estábulos leiteiros, seqüências *stx* e *rfb* O157 e O113 de *Escherichia coli*. A qualidade da água é um fator importante que deve ser considerado no processo de obtenção do leite, pois, por meio dela microrganismos patogênicos podem contaminar esse alimento, colocando em risco a saúde da população que o consumir. É por esta razão que, nos EUA, segundo normas de produção do leite pasteurizado, a água utilizada em todas as etapas da produção deve ter características de potabilidade (WILLERS et al., 1999).

Em 41 amostras de água analisadas, foram detectadas *E. coli* com 19,51% de seqüência *stx*, 4,88% de seqüência *rfb* O113 e 2,44% de seqüência *rfb* O157 (Figura 11), a detecção destes microrganismos nessas amostras, associada aos dados de literatura retro descritos revelaram a importância do tratamento da água destinada, não só ao consumo humano, como também ao consumo animal e à produção de leite.

Os vários surtos e casos esporádicos de enfermidades causadas por *E. coli* O157 de gado leiteiro enfatizam o papel do leite como um importante veículo de transmissão (REITSMA & HENNING, 1996). Em relação ao sorotipo O157:H7, dois surtos nos EUA (HERRIOTT et al., 1994; USDA-APHIS-VS, 1997) foram causados pelo

consumo de leite cru em 1992 (9 casos) e 1993 (6 casos) e ocorreram em duas propriedades leiteiras com licença para vender leite não pasteurizado (USDA-APHIS-VS, 1994). A ingestão de leite cru nos EUA resultou em casos de SHU em Wisconsin (MARTIN et al., 1986), Washington (WELLS et al., 1991), e Oregon (KEENE et al., 1997). Leite sem pasteurização também provocou infecção por STEC no Canadá (BORCZYK et al., 1987; WILSON et al., 1996) e Finlândia (LAHTI et al., 2002). No entanto, o consumo de leite “in natura” decaiu de 429 milhões de quilos em 1980 para 230 milhões em 1990 (USDA, 1992). Esta estatística pode explicar porque o número de surtos com STEC causados pelo consumo de leite cru têm sido pequeno (HUSSEIN & SAKUMA, 2005).

Um dos maiores surtos de *Escherichia coli* O157 associado ao consumo de leite foi relatado por UPTON & COIA (1994). Foram afetadas mais que 100 pessoas, um terço das quais foram hospitalizadas, nove crianças desenvolveram SHU, seis precisaram de diálise, uma mulher idosa desenvolveu púrpura trombocitopênica trombótica. Investigações epidemiológicas revelaram que mais que 90% dos infectados haviam consumido leite pasteurizado envasado em caixa de papelão ou garrafas de uma laticifera local. Acredita-se que sete casos resultaram do contágio secundário, pessoa-a-pessoa, nas próprias casas. Várias amostras foram colhidas e *E. coli* O157 foi encontrada na tubulação que conduzia o leite do pasteurizador à máquina de engarrafamento e numa borracha da máquina de engarrafamento.

A infecção por *E. coli* O157 também já foi associada ao consumo de derivados do leite como queijo (CDC, 2000b), iogurte (MORGAN et al., 1993) e manteiga (REID, 2001).

Neste estudo, STEC foi detectada em 33,33% das amostras de leite colhidas do tanque de resfriamento (Figura 12). Como a detecção foi feita por PCR, a prevalência encontrada foi bem maior que outras anteriormente descritas, por exemplo, ADESIYUM et al. (1997) isolaram 18,5% de STEC do leite do tanque de resfriamento, HUSSEIN & SAKUMA (2005) isolaram 3,8% e KLIE et al. (1997) relataram incidência de STEC em 3,9% do leite cru e 2,1% no leite certificado, na Alemanha.

Embora não tenham sido encontrados relatos de *E. coli* O113 provocando infecção em seres humanos, associada ao consumo de leite e derivados, este

sorogrupos já foi isolado destes tipos de alimentos. WILSON et al. (1996) e SANDHU et al. (1996) isolaram O113 de leite cru e PRADEL et al., (2000), de queijo.

O gado leiteiro, fonte tanto de produtos cárneos quanto de leite cru, é considerado como um hospedeiro natural de cepas STEC O157 patogênicas ao ser humano (HEUVELINK et al., 1998). O leite e produtos cárneos são os responsáveis pela maioria dos surtos de origem alimentar causados por esse microrganismo. Portanto, os 10% de seqüências *rfb* O157, 10% de *rfb* O113 e 33,33% de seqüência *stx* encontradas no crescimento de *E. coli* nas amostras de leite cru, constituem-se um risco à Saúde Pública (Figura 12).

É uma preocupação da indústria leiteira o fato de bactérias patogênicas serem transmitidas aos seres humanos por meio do leite e seus subprodutos (VASAVADA, 1988). A *E. coli* O157 é um destes patógenos humanos. Práticas de higiene durante o processo de ordenha podem diminuir a contaminação fecal do leite cru, mas a pasteurização adequada e a prevenção da contaminação pós-pasteurização são medidas necessárias para garantir a segurança deste alimento (HEUVELINK et al., 1998). Ademais um modo efetivo na prevenção de surtos associados ao leite é evitar sua ingestão na forma crua (BLEEM, 1994).

Os parágrafos anteriores mostram que a possibilidade de contaminação do leite cru com *E. coli* patogênicas está potencialmente presente durante o processo de ordenha em propriedades leiteiras. Uma vez que as fontes são as fezes, o conteúdo ruminal e o ambiente da propriedade, os microrganismos podem contaminar o couro, úbere e superfície do teto das vacas. A contaminação superficial do teto pode conduzir a uma futura contaminação do leite cru (MATTHEWS et al., 1997). Além disso, a contaminação do teto, conforme foi relatado previamente, conduz a infecção intramamária com *E. coli* (BRAMLEY et al., 1981). Na Figura 13, podemos observar que duas (7,14%) amostras de orifício de teto apresentaram STEC, caracterizando-o como um importante local onde deve ser feito controle. A correta anti-sepsia dos tetos antes da colocação das teteiras ou antes da ordenha manual, deve ser praticada a fim de minimizar riscos à saúde pública, pois limita a contaminação bacteriológica do leite.

Segundo o NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1998) os fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos patogênicos contagiosos são a

ordenhadeira, a mão do ordenhador, práticas de higiene inadequadas e lesões nos tetos.

Portanto, outro ponto de controle importante é a mão do ordenhador, neste trabalho, um (3,57%) suabe de mão apresentou STEC, as mãos do ordenhador contaminadas podem, não só carrear patógenos de um a outro animal, como também aumentar o risco de infecção do próprio ordenhador. De acordo com RIBEIRO (2001), os ordenhadores devem ser qualificados, por meio de treinamentos específicos, pois representam a única ligação da vaca com o equipamento de ordenha, além do que, ordenhadores sem bons hábitos de higiene podem, por meio das mãos, constituir uma fonte de contaminação para as vacas e o leite.

GRAAF et al. (1997) relatam que os equipamentos de ordenha mal higienizados são um dos principais veículos de contaminação para o leite cru. Embora não tenham sido detectados nenhum dos microrganismos alvo dessa pesquisa, em insuflador de ordenhadeira, faz-se necessária a utilização da higiene e desinfecção do equipamento de ordenha, por ser esta, uma importante medida para a redução do número de microrganismos no leite (KIM, 1995).

Sendo assim, é de suma importância a utilização de medidas higiênico-sanitárias rigorosas durante todo o processo de obtenção do leite, que vão desde a higiene das mãos do ordenhador até a correta sanitização e manutenção dos equipamento de ordenha.

Observando a Tabela 10, é possível notar que grande parte (72,97%) das cepas de *E. coli* O157 isoladas possuíam o gene de virulência *hly*, este dado é relevante uma vez que na maioria (88%) das infecções humanas por O157 e outras STEC, os patógenos possuem o gene *hly* (BEUTIN et al., 1994).

Através das Tabelas 10 e 11 nota-se que em algumas amostras PCR positivas não foi possível a obtenção de cepas isoladas de *Escherichia coli* O157, O111 e O113. Vários são os fatores que podem ter levado a esta diferença entre os resultados da PCR e do isolamento. Primeiro, o grau de sensibilidade da PCR é muito elevado, vide sua capacidade de detectar a presença de uma única célula de STEC em meio a outros 10^8 coliformes (PATON et al., 1993). PATON et al., (1996) também afirmaram que a PCR é altamente valiosa para detectar a presença de STEC em culturas de fezes e

alimentos, mas que o subsequente isolamento pode ser bastante trabalhoso. ARTHUR et al. (2002) comparando a quantidade de amostras positivas para genes *stx* por PCR (76,8%) e a quantidade de amostras em que STEC foram isoladas por hibridização (50,5%) concluíram que a prevalência de STEC seria subestimada se calculada com base na quantidade de STEC isoladas.

Segundo, o volume do inóculo, suabe retal, pode ter sido insuficiente para o isolamento nas amostras em que o microrganismo pesquisado estivesse presente, mas em pequena quantidade. Com relação a isso KUDVA et al. (1995) observaram que em amostras fecais contendo baixos níveis de *E. coli* O157 (0,06 UFC/g), foi imperativo para o isolamento do microrganismo que de 1 a 10g de fezes fosse analisada. Quando uma quantidade menor de material sabidamente positivo, como um suabe de fezes, foi analisado o resultado foi negativo. Ademais, LAHTI et al. (2003) relataram isolamento de *E. coli* O157 com frequência significativamente maior de amostras de fezes com 10g, que de amostras com 1g.

Kudva e seus colaboradores notaram também que a relação entre o material fecal e o volume do meio de enriquecimento influenciavam a sensibilidade da técnica de isolamento. Por exemplo, *E. coli* O157:H7 foi isolada quando 1g de fezes foi enriquecido em 50mL de meio de cultura, mas o mesmo não ocorreu quando apenas 7mL de meio foi usado no enriquecimento. Esta pode ser a terceira razão porque a taxa de isolamento foi menor que a detecção por PCR; a quantidade de meio de cultura utilizada no enriquecimento das amostras, 10mL, nos casos em que não se logrou o isolamento, pode ter sido insuficiente.

Em quarto lugar, as amostras foram congeladas a -20°C , em meio de enriquecimento com glicerol, por pelo menos um ano antes de ser feito o isolamento. De acordo com ARTHUR et al. (2002), sob condições semelhantes em trabalho por eles realizado, foi provável que algumas bactérias não estivessem mais viáveis após o descongelamento, o mesmo afirmaram BONARDI et al. (1999). Portanto, o número de microrganismos não viáveis teria contribuído para o número de amostras PCR positivas, mas não teriam sido isolados (ARTHUR et al., 2002).

Quinto, segundo VOLD et al. (1998) algumas cepas de *E. coli* O157 são aparentemente sensíveis ao telurito de potássio a 2,5 mg/L, concentração

recomendada pelo fabricante para ser adicionada ao Sorbitol MacConkey, ágar seletivo para isolamento de *E. coli* O157 por separação imunomagnética (IMS). De acordo com este autor, a redução na quantidade de telurito para 0,65 mg/L continuou inibindo o crescimento da microbiota indesejável, enquanto o crescimento de *E. coli* O157 que não haviam se desenvolvido no ágar com a concentração original de telurito, foi estimulado. No presente estudo, a quantidade de telurito de potássio utilizada foi de 2,5 mg/L, isto pode ter prejudicado o isolamento de algumas cepas de O157.

Somente uma amostra de fezes foi O111 PCR positiva, da qual não foi isolada cepa de *E. coli* O111 por meio da IMS, no entanto, segundo dados de um trabalho realizado por PATON et al. (1996), apenas três das cinco STEC O111 PCR positivas, puderam ser isoladas de amostras de lingüiça por meio da IMS. SAFARIKOVA & SAFARÍK (2001) também relataram que a IMS não foi capaz de isolar *E. coli* O111 de uma amostra de alface previamente inoculada com este sorogrupo e, atribuíram esta falha a maior contaminação por outros microrganismos, desta amostra, com relação às outras, que também estavam sendo estudadas e nas quais o isolamento foi possível. Em amostras de fezes, a quantidade de outros microrganismos competidores é muito mais elevada, o que pode ter interferido no isolamento, mesmo utilizando-se meio seletivo.

E. coli O157 e O113 não foram isoladas das amostras de água PCR positivas, provavelmente pelos mesmos motivos já citados para as amostras de fezes, além do que, na maioria dos surtos de doença gastrointestinal envolvendo água, o agente etiológico não é recuperado (ROSE, 1990).

Apenas de uma das seis amostras de leite O157 e O113 PCR positivas foi isolada *E. coli* O113. De acordo com HEUVELINK et al. (1998) o fracasso por eles obtido em tentar isolar STEC O157 de amostras de leite de tanque de resfriamento pode ter sido devido à diluição das amostras contaminadas de cada animal individualmente a níveis de contaminação muito baixos, quando todas foram misturadas no tanque. Em duas investigações de rebanhos leiteiros associados à infecção em seres humanos por *E. coli* O157, os patógenos não foram isolados do leite do tanque de resfriamento, mas foram isolados de amostras de leite colhidas dos animais individualmente (WRIGHT et al., 1994, MECHIE et al., 1997).

Diante dos fatos apresentados com relação a dificuldade de isolamento de cepas provenientes de amostras PCR positivas, concluiu-se que a reação em cadeia da polimerase é uma técnica importante na determinação da prevalência de *Escherichia coli* shigatoxigênicas.

As taxas de prevalência de STEC em rebanhos apresentam flutuações significativas ao longo do tempo (HANCOCK et al., 1998). Nota-se esta variação quando da comparação entre os resultados obtidos neste estudo (Tabela 12 e Figura 14), em que STEC foram identificadas em todos os rebanhos (100%) e os sorogrupos O157, O111 e O113 foram observados em 60%, 10% e 100% dos rebanhos, respectivamente, com os resultados obtidos por VICENTE et al. (2005) que analisando os mesmos rebanhos dois anos antes obtiveram, os seguintes resultados para STEC, O157, O111 e O113, respectivamente, 100%, 40%, 50% e 90%.

Testes repetidos demonstraram que STEC estão, pelo menos ocasionalmente, presentes na maioria das fazendas (HANCOCK et al., 1997a, HANCOCK et al., 1997b). Esta afirmação foi confirmada, de acordo com o descrito no parágrafo anterior, em dois testes sucessivos com intervalo de dois anos, todos os rebanhos foram positivos para STEC. Tais dados evidenciam que estes grupos de bactérias estão amplamente difundidos entre os animais de propriedades rurais do Município de Jaboticabal-SP, o que implica numa grande contaminação do ambiente rural, elevando os riscos de infecção para os seres humanos, uma vez que, as fezes dos bovinos e o esterco expostos no campo podem se tornar uma fonte direta ou indireta, de contaminação por STEC, já que a dose infectante é estimada em menos que dez bactérias (TARR, 1995).

A transmissão direta de STEC O157:H7 de animais para humanos já foi várias vezes relatada. RENWICK et al. (1993) descreveram a transmissão da *Escherichia coli* O157:H7 a uma criança exposta a bezerros infectados, e RICE et al. (1996) constatou a bactéria nas fezes de um garoto que apresentava severa diarreia sanguinolenta e estava diretamente ligado a criação do rebanho. Além desses casos em que a transmissão ocorreu diretamente dos animais aos moradores das propriedades, foram constatados na literatura quatro surtos, com 729 pessoas afetadas, a maioria crianças, e 30 casos de SHU, nos EUA, em que a transmissão de animais a humanos ocorreu após visitas a fazendas ou mini-zoológicos de animais domésticos. Durante as visitas

era permitido às pessoas tocar e alimentar os animais, assim como comer e beber enquanto interagem com eles. Além do contato direto com os animais a infecção também foi relacionada a tocar ou pisar em esterco e cair ou sentar no chão (CDC, 2001, CDC, 2006a). Em um estudo realizado por BELONGIA et al. (2003) chegou-se a conclusão de que crianças que moram em fazendas são comumente expostas à *E. coli* O157:H7, mas não há um correspondente aumento na incidência de diarreia clinicamente aparente. Acredita-se que o estímulo antigênico repetido nessas crianças poderia prevenir a doença. Ainda segundo os autores, esforços preventivos deveriam enfatizar a educação e a intervenção para evitar a transmissão a populações mais sensíveis, particularmente crianças na pré-escola e aquelas que têm contato com animais de fazenda mas sem exposições repetidas.

Surtos de STEC envolvendo vegetais indicam que as fezes dos bovinos podem contaminar também este tipo de alimento. A contaminação pode ocorrer quando eles são cultivados em campos fertilizados com esterco tratado incorretamente, através da irrigação com água contaminada pelas fezes ou pela água em que são lavados (SOLOMON et al., 2002).

Em um estudo de várias amostras ambientais em propriedades leiteiras, STEC foram encontradas em comedouros e baias de bezerros e vacas, sendo assim o ambiente da propriedade pode permanecer contaminado por vários meses (BLANCO et al., 2001). As fezes dos bovinos são uma fonte potencial para a disseminação de STEC à cadeia de alimentação humana e ao ambiente. O controle efetivo de STEC no rebanho leiteiro e o manejo ou uso adequado das fezes dos bovinos são necessários para que a contaminação ambiental e de alimentos por estes patógenos seja prevenida (WANG et al., 1996).

De acordo com HUSSEIN & SAKUMA (2005), considerando a ampla distribuição de STEC em propriedades leiteiras, as altas taxas de prevalência já relatadas e o isolamento de vários sorotipos de alta virulência de rebanhos leiteiros e seus produtos, deveriam ser desenvolvidas estratégias em longo prazo para garantir a segurança de alimentos provenientes desses rebanhos. Estas estratégias poderiam incluir o estabelecimento de programas para conscientizar fazendeiros, trabalhadores e consumidores do risco das STEC. É essencial desenvolver e implementar métodos de

controle pré e pós abate para reduzir efetivamente o número de bovinos portadores de STEC e eliminar a contaminação dos seus produtos durante o processamento.

Os esforços para reduzir a prevalência destes microrganismos precisam ser direcionados para o controle da infecção no reservatório bovino (RAHN et al., 1997). O manejo adequado de dejetos é uma das práticas a qual evita que as fezes bovinas se tornem fonte de contaminação ambiental por STEC. Quando mal manejados e utilizados, os dejetos oferecem riscos sanitários ao homem e animais. A eliminação deficiente das excretas dificulta as condições higiênicas das instalações, favorecendo a difusão de vários microrganismos patogênicos, a proliferação de moscas e outros parasitas, além da produção de odores desagradáveis e gases nocivos (DOMINGUES & LANGONI, 2001). Ademais, resíduos depositados diariamente no solo aumentam muito o risco de contaminação da água subterrânea (CONBOY & GOSS, 2000).

Segundo KUDVA et al. (1995) a *Escherichia coli* O157 pode sobreviver por pelo menos seis semanas nas fezes e possivelmente se multiplicar neste material, além disso, PORTER et al. (1997) relataram que o sorotipo O157:H7 foi isolado com maior frequência de amostras ambientais colhidas próximas ao depósito de esterco dos animais e, rebanhos que pastejam em piquetes tratados com esterco podem apresentar uma prevalência de STEC e O157 maior (HANCOCK et al., 1994).

Além do manejo adequado de dejetos, existem outras medidas a serem tomadas a fim de reduzir a disseminação das STEC, tais como, evitar a introdução de animais infectados no rebanho, principalmente bezerros e novilhas, fazer a desinfecção adequada das baias antes de introduzir novos animais, controlar o contato entre bezerros e vacas, oferecer água potável, manter bebedouros e comedouros limpos, prover cama adequada e acomodações limpas (RAHN et al., 1997, STEVENS et al., 2002, LAHTI et al., 2003).

Embora a incidência de infecção em humanos por STEC seja, relativamente, baixa, a gravidade dos sintomas e a frequência de seqüelas renais e neurológicas são motivos de preocupação. A doença é de relevância em saúde pública e existe a necessidade de desenvolver tratamento ou medidas de prevenção. Já houve um considerável progresso em compreender a ecologia das STEC em hospedeiros animais e os modos de transmissão aos seres humanos. Estratégias para reduzir a prevalência

em bovinos são cruciais para a diminuição da incidência de infecção em humanos (STEVENSON et al., 2002).

O uso de probióticos, bacteriófagos e regimes de alimentação que criam um ambiente intestinal hostil para as STEC, podem ser úteis antes do abate para reduzir a entrada de EHEC na cadeia alimentar e pesquisas a esse respeito têm sido desenvolvidas nos últimos anos (STEVENSON et al., 2002).

Vacinas para evitar a infecção em animais (DEAN-NYSTROM, 2002) e em crianças (AHMED et al., 2006) também estão sendo desenvolvidas e podem ajudar a diminuir a incidência em seres humanos.

Como consideração final, pode-se afirmar que os bovinos leiteiros são importantes reservatórios de STEC, levando, por meio de suas fezes, à contaminação não só do ambiente rural, mas também da água e do local de ordenha, incluindo mão de ordenhador, teto e leite, o que constitui um sério risco à saúde pública. Tendo em vista a severidade da infecção causada por STEC, destaca-se a importância do manejo adequado de dejetos, além das práticas adequadas de higiene durante todo o processo de obtenção do leite, com a finalidade de evitar que estes patógenos se disseminem e alcancem a cadeia alimentar humana.

Novos estudos podem ser realizados com a finalidade de esclarecer o porquê de haver tão poucas infecções por STEC relatadas no Brasil, uma vez que este e outros trabalhos já mostraram que a prevalência desses patógenos, não só no rebanho, mas também em produtos alimentícios, é elevada. É possível que sem que seja constatado, crianças e adultos estejam apresentando, de forma endêmica, infecções por STEC, tendo assim, sua qualidade de vida prejudicada.

8. REFERÊNCIAS

ADESIYUN, A. A. et al. Prevalence and characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from milk and feces of cows on dairy farms in Trinidad. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, p. 1174-1181, 1997.

AHMED, A. et al. Safety and Immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-Specific Polysaccharide Conjugate Vaccine in 2–5-Year-Old Children. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, p. 515–21, 2006.

AMARAL, L. A. **A Água como Fator de Risco para Saúde Humana e Saúde Animal em Propriedades Leiteiras Situadas na Região Nordeste do Estado de São Paulo**. 2001. 133f. Tese (Livre docência em Epidemiologia Geral e Saneamento) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 16. ed. New York: Stanford University Libraries, 1992.

ARTHUR, T. M. et al. 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, p. 4847–4852, 2002.

BANATVALA, N. et al. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: Microbiologic, Serologic, Clinical, and Epidemiologic Findings. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, p. 1063–70, 2001.

BARKOCY-GALLAGHER, G. A. et al. Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the midwestern states of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3810–3818, 2001.

BARRET, T. J. et al. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 165, p. 979-980, 1992.

BELONGIA, E. A. et al. Diarrhea incidence and faro-related risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* antibodies among rural children. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, p. 1460-1468, 2003.

BESSER, T. E. et al. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 175, p. 726-729, 1997.

BETTELHEIM, K. A. Non-O157 Verotoxin-Producing *Escherichia coli*: A Problem, Paradox, and Paradigm. **NON-O157 VTEC SUPPLEMENT**. Society for Experimental Biology and Medicine, 333-344, 2003.

BEUTIN, L. et al. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 2483-2488, 1993.

BEUTIN, L. et al. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v.183, p. 13–21, 1994.

BLANCO, J. et al. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galia (North-western Spain). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p. 297-311, 1988.

BLANCO, M. et al. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, p. 1446-1451, 1993.

BLANCO, J. E. et al. Brote de gastroenteritis asociado con un *Escherichia coli* verotoxigenico O111:H- VT1+ eae+. **Alimentaria**, Madrid, v. 275, p. 109-113, 1996a.

BLANCO, M. et al. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 12, p. 13-14, 1996b.

BLANCO, M. et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from health cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 54, p. 309-319, 1997.

BLANCO, J. et al. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: DUFFY, G., GARVEY, P., MCDOWELL, D. **Verocytotoxigenic *Escherichia coli***. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2001. p. 113–148.

BLEEM, A. *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk: A review. **Annual Health Insight, Suffolk**, p. 1-9, 1994.

BOERLIN, P. et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 497-503, 1999.

BONARDI, S. et al. Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 203-211, 1999.

BORCZYK, A. A. et al. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, London, v. 1, p. 98, 1987.

BRAMLEY, A. J. GODINHO, K. S.; GRINDAL, R. J. Evidence of penetration of the bovine teat duct by *Escherichia coli* in the interval between milkings. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 379-386, 1981.

BRIAN, M. J. et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 1801-1806, 1992.

BROOKS, J. T. et al. Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111:H8 Infections among Attendees of a High School Cheerleading Camp. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38. p. 190-198, 2004.

BROOKS, J. T. et al. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983-2002. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 192, p. 1422-1429, 2005.

BÜRK, C. et al. Nuclease fluorescence assay for the detection of verotoxin genes in raw milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 153–156, 2002.

BUSATO, A. et al. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 69, p. 251-263, 1999.

CAPRIOLI, A. et al. Community-wide outbreak of hemolytic-uremic-syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 169, p. 208-211, 1994.

CARLSON, C. Investigation of an *Escherichia coli* O111:NM outbreak in a daycare in South Dakota [session 22, board 80]. In: PROGRAM AND ABSTRACTS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2002, Atlanta. Program an abstracts... Atlanta: Centers for Disease Control Prevention, 2002, p. 94.

CDC - MMWR. *Escherichia coli* O111:H8 Outbreak Among Teenage Campers – Texas, 1999. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 283, n. 19, p. 2517-2518, 2000a.

CDC - MMWR. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated with Eating Fresh Cheese Curds – Wisconsin, June 1998. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 284, n. 23, p. 2991-2992, 2000b.

CDC - MMWR. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Among Children Associated With Farm Visits – Pennsylvania and Washington, 2000. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 285, n. 18, p. 2320-2322, 2001.

CDC - MMWR. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated with Petting Zoos-North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 295, n. 4, p. 378-380, 2006a.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm>. Acesso em: 26 fev. 2006b.

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

CERQUEIRA, A. M. F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 111-121, 1999.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; HIGGINS, R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E coli* O157. **Veterinary Record**, London, v. 133, p. 171-172, 1993.

CHAPMAN, P. A. et al. A one year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 245-250, 1997.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

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

COBBOLD, R. N. et al. Comparison of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Prevalences among Dairy, Feedlot, and Cow-Calf Herds in Washington State. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4375–4378, 2004.

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

CONBOY, M. J.; GOSS, M. J. Natural protection of groundwater against bacteria of fecal origin. **Journal of Contaminant Hydrology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 1-24, 2000.

CORDOVEZ, A. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2153-2157, 1992.

CRAY JR, W. C.; MOON, H. W. Experimental Infection of Calves and Adults Cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1586-1590, 1995.

CULLOR, J. S. HACCP (Hazard analysis critical control points): is it coming to the dairy?

Journal of Dairy Science, Champaign, v. 80, p. 3449-3452, 1997.

DARGATZ, D. A. et al. Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in feces of feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 5, p. 466-470, 1997.

DEAN-NYSTROM, E. A. et al. Vaccination of pregnant dams with intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, 2414-2418, 2002.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Manejo de Dejetos. In: **Manejo Sanitário Animal**. São Paulo: Editora de Publicações Biomédicas, 2001. p. 59.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 10, p. 2394-2396, 1987.

DOYLE, M. P. et al. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P. et al. **Foodborne Pathogenic Bacteria**. ASM Press, 1995. p. 171-191.

DUPONT, H. L. et al. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 285, p. 1-9, 1971.

EFFLER, P. et al. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 5, p. 812-819, 2001.

EKLUND, M.; SCHEUTZ, F.; SIITONEN, A. Clinical Isolates of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Serotypes, Virulence Characteristics, and Molecular Profiles of Strains of the Same Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2829-2834, 2001.

ELDER, R. O.; et al. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 97, p. 2999–3003, 2000.

ELDER, W. W.; LAEGREID, M.; KOOHMARAIE. Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3810–3818, 2001.

FAGAN, P. K. et al. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx*₁ e *stx*₂), 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.

FAITH, N. G. et al. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1519-1525, 1996.

FDA. **Manual de Enfermidades Transmitidas por Alimentos**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 1999, p. 27-29.

FONG, J. S. C.; CHADAREVIAN, J. P.; KAPLAN, B. S. Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, p. 835-856, 1982.

FUKUSHIMA, H.; HOSHINA, K.; GOMYODA, M. Long-Term Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in Bovine Feces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 5177–5181, 1999.

GARBER, L. P. et al. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy

calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 207, n. 1, p. 46-49, 1995.

GRAAF, T. et al. JJR. Microbiological quality aspects of cow's milk at a smallholder cooperative in Turrialbe-Costa Rica. **Revue d'Elevage Medecine Veterinaire Pays Tropicaux**, Cachan Cedex, v. 50, n. 1, p. 57-64, 1997.

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.

GUTH, B. E. C. et al. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 535–536, 2002a.

GUTH, B. E. C. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1085–1089, 2002b.

GYLES, C. et al. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4134–4141, 1998.

HANCOCK, D. D. et al. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 199-207, 1994.

HANCOCK, D. D. et al. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 118, p. 193-195, 1997.

HANCOCK, D. D. et al. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy

farms in the Northwestern USA. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 35, p. 11-19, 1998.

HENNING, P. H. et al. Haemolytic-uraemic syndrome outbreak caused by *Escherichia coli* O111:H-: clinical outcomes. **Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 168, p. 552-555, 1998.

HERRIOTT, D. E. et al. Raw milk associated *E. coli* O157:H7 outbreaks in Oregon. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL HYGIENE. 8, 1994, Saint Paul. **Proceedings...** Saint Paul: International Society of Animal Hygiene, 1994. p. 17–21.

HEUVELINK, A. E. et al. Occurrence and Survival of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Raw Cow's Milk in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 12, p. 1597-1601, 1998.

HUSSEIN ,H. S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 450–465, 2005.

INGAWA, K.; ADKINSIN, R.; GOUGH, R. Evaluation of a gel teat cleaning and sanitizing compound for premilking hygiene. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 1224-1232, 1992.

IRINO, K. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 446-447, 2002.

JACKSON, S. G. et al. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 120, p. 17-20, 1998.

JINNEMAN, K. C. et al. Comparison of Template Preparation Methods from Foods for Amplification of *Escherichia coli* O157 Shiga-Like Toxin Type I and II DNA by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 7, p. 722-726, 1995.

JOHNSON, J. L.; BROOKE, C. L.; FRITSCHER, S. J. Comparison of the BAX for screening/ *E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4390-4395, 1998.

JOHNSON, R. P. et al. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, p. 1112-1122, 1996.

KARMALI, M. A. et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 151, p. 775-782, 1985.

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

KARMALI, M. A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to *Escherichia coli* Vero cytotoxin 1. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 1457-1463, 1994.

KATIC, V.; RADENKROV, S. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized milk. **Acta Veterinaria**. Belgrad, v. 48, n. 5-6, p. 345-350, 1998.

KATSUYA, E. M. et al. *Escherichia coli* O157: H7, Um Enteropatógeno Emergente. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1,

1998, São Paulo. **Revista CIP...** São Paulo: Coordenação dos Institutos de Pesquisa, 1998.

KEENE, W. E. et al. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, p. 815–818, 1997.

KIM, J. W. Studies on bacteriological condition in milking environment. **Korean Journal of Dairy Science**, n. 17, v. 2, p. 113-122, 1995.

KIRK, J. H.; PRICE, S.; WRIGHT, J. C. *Escherichia coli* O157:H7 in milk. **Large Animal Practice**. v. 18, n. 2, p. 16-19, 1997.

KLEANTHOUS, H. et al. Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: microbiological aspects. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 65, p. 722-727, 1990.

KLIE, H. et al. Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or Shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 110, p. 337–341, 1997.

KOBAYASHI, H. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 484–489, 2001.

KUDVA, I. T.; HATFIELD, P. G.; HOVDE, C. J. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1363-1370, 1995.

KUDVA, I. T.; HATFIELD, P. G.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 431-433, 1996.

LACK, T. Water and Health in Europe: an overview. **British Medical Journal**, London, v. 318, n. 7199, p. 1678-1682, 1999.

LAHTI, E. et al. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 21, p. 189-195, 2002.

LAHTI, E. et al. Longitudinal Study of *Escherichia coli* O157 in a Cattle Finishing Unit. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 554-561, 2003.

LAW, D.; KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga like toxin producing *E. coli* serogroups. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, p. 700-702, 1995.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 155, n. 3, p. 377-389, 1987.

MARTIN, M. L. et al. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, London, p. 8514-1043, 1986.

MATTHEWS, K. R.; MURDOUGH, P. A.; BRAMLEY, A. J. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 82, p. 197-203, 1997.

MACDONALD, J. et al. Studying the effects of backflushing milking units. **Veterinary Medicine**, Chicago, p. 382-386, 1993.

MCNALLY, A. et al. Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 510-5114, 2001.

MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, London, v. 352, p. 1207-1212, 1998.

MECHIE, S. C.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 118, p. 17-25, 1997.

MIGUEL, O. Técnicas de amostragem para exames laboratoriais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 84-89, 1982.

MIYAO, Y. et al. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* harbored in the intestine of cattle in Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 137-143, 1998.

MONTENEGRO, M. A.; BULTE, M.; TRUMPF, T. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 1417-1421, 1990.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, Washington, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORABITO, S. et al. Molecular characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serogroup O111 from different countries. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 48, p. 891-896, 1999.

MOREIRA, C. N. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 93, p. 179-183, 2003.

MORGAN, D. et al. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.111, p. 181–187, 1993.

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

NATIONAL CATTLEMEN'S BEEF ASSOCIATION. 2001. **Cattle and beef industry statistics**. National Cattlemen's Beef Association, Centennial, Colo.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Arlington. p.64, 1998.

ORDEN, J. A. et al. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 29–35, 2002.

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

OSTROFF, S. M.; KOBAYASHI, J. M.; LEWIS, J. H. Infectious with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 262, p. 355-359, 1989a.

OSTROFF, S. M. et al. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 160, p. 994-999, 1989b.

PATON, A. W. et al. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 3063-3067, 1993.

PATON, A. W. et al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 1622-1627, 1996.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Strains Belonging to Serogroups O111, O157, and O113 by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3362-3365, 1999.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Multiplex PCR for Direct Detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Strains Producing the Novel Subtilase Cytotoxin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2944-2947, 2005.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PORTER, J. et al. Detection, distribution and probable fate of *Escherichia coli* O157 from asymptomatic cattle on a dairy farm. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 83, p. 297-306, 1997.

PRADEL, N. et al. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1023–1031, 2000.

PRADO, V. et al. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), the most important cause of hemolytic uremic syndrome in children. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 123, p. 13-22, 1995.

PRITCHARD, G. C. et al. Wild rabbits: a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia*

coli O157. **Veterinary Record**, London, v. 149, p. 567, 2001.

RAHN, K. et al. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 251-259, 1997.

RANDALL, L. P.; WRAY, C.; DAVIES, R. H. Survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 under simulated farm conditions. **Veterinary Record**, London, v. 145, p. 500-501, 1999.

REID, T. M. S. A case study of cheese associated *E. coli* O157 outbreaks in Scotland. In: DUFFY, G., GARVEY, P., MCDOWELL, D. **Verocytotoxigenic *Escherichia coli***. Trumbull: Food and Nutrition Press Inc, 2001. p. 201–212.

REITSMA, C. J.; HENNING, D. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, p. 460–464, 1996.

RENTER, D. G. et al. Diversity, Frequency, and Persistence of *Escherichia coli* O157 Strains from Range Cattle Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 542-547, 2003.

RENWICK, S. A.; WILSON, J. B.; CLARKE, R. C. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 168, p. 792-793, 1993.

RIBEIRO, M. T. Dimensionamento e funcionamento de equipamento de ordenha e tanques de resfriamento, visando a qualidade do leite. In: MARTINS, C. E.; ALENCAR, C. A. B.; BRESSAN, M. **Sustentabilidade da Produção de Leite no Leste Mineiro**. Juiz de Fora: Embrapa, 2001. p. 167-174.

RICE, D. H.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Verotoxigenic *E. coli* O157 colonization of wild deer and range cattle. **Veterinary Record**, London, v. 4, p. 524, 1995.

RICE, D. H. et al. *Escherichia coli* O157 infection in a human linked to exposure to infected livestock. **Veterinary Record**, London, v. 138, p. 311, 1996.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 308, p. 681-685, 1983.

RIOS, M. et al. Clonal diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 778-781, 1999.

RIVAS, M. et al. Síndrom Urémico Hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Medicina**, Buenos Aires, v. 58, p. 1–7, 1998.

RODRIGUE, D. C. et al. A University Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Roast Beef and an Unusually Benign Clinical Course. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, p. 1122-1125, 1995.

ROSE, J. B. Environmental sampling for waterborne pathogens: Overview of methods, application limitations and data interpretation. In: CRAUN, G. F. **Methods for the investigation and prevention of waterborne disease outbreaks**. Cincinnati, Ohio: Health Effects Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, 1990, p. 223-234.

SAFARIKOVA, M.; SAFARIK, I. Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 36-39, 2001.

SANDHU, K. S. et al. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 116, p. 1–7, 1996.

SANZ, M. E.; VINAS, M. R.; PARMA, A. E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 14, p. 399-403, 1998.

SARGEANT, J. M. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 215, n. 6, p. 792-794, 1999.

SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic Phenotypes and Genotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111 Strains from Patients with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 10, p. 2364–2367, 1996.

SCHOONDERWOERD, M. et al. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111:NM. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 52, p. 484-487, 1988.

SHERE, J. A.; BARTLETT, K. J.; KASPAR, C. W. Longitudinal Study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 4, p. 1390-1399, 1998.

SOLOMON, E. B.; YARON, S.; MATTHEWS, K. R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 397-400, 2002.

SOUZA, L. C. et al. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, p. 112-22, 1983.

SPARLING, P. H. *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks in the United States, 1982-1996. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 213, n. 12, p.

1733, 1998.

STEVENS, M. P. et al. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 3767–3778, 2002.

SWERDLOW, D. L. et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 117, n. 10, p. 812-819, 1992.

TANAKA, H. et al. Bacteriological investigation on an outbreak of acute enteritis associated with verotoxin-producing *Escherichia coli* O111:H [Japanese]. **Kansenshogaku Zasshi Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, Tokyo, v. 63, p. 1187-1194, 1989.

TARR, P. I. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, p. 1-8, 1995.

TARR, P. I.; GORDON, C. A.; CHANDLER, W. L. Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, London, v. 365, p. 1073-1086, 2005.

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

TUTENEL, A. V. et al. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 261, p. 1-7, 2002.

TZIPORI, S. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. **Gut**, London, v. 26, p. 570-578, 1985.

UPTON, P.; COIA, J. E. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. **The Lancet**, London, v. 344, p. 1015, 1994.

USDA. Agricultural Statistics 1992. Agricultural Statistics Board, USDA, Washington, DC. In: **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 450–465, 2005.

USDA-APHIS-VS. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 in US Dairy Calves. January Report, National Animal Health Monitoring System. USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Service, Centers for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, CO. In: **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 450–465, 2005.

USDA-APHIS-VS. 1997. An update: *Escherichia coli* O157:H7 in humans and cattle. USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Service, Centers for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, CO. In: **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 450–465, 2005.

VASAVADA, P. C. Pathogenic bacteria in milk – A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 2809-2816, 1988.

VAZ, T. M. I et al. 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.

VICENTE, H. I. G.; AMARAL, L. A.; CERQUEIRA, A. M. F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* Serogroups O157, O111 and O113 in Feces, Water and Milk Samples from Dairy Farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 217-222, 2005.

VOLD, L. et al. Occurrence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 120, p. 21-28, 1998.

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

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2567–2570, 1996.

WEINSTEIN, D. L.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, p. 106-111, 1988.

WELLS, J. G. et al. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 985-989, 1991.

WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP MEETING. 1998, Berlin, Germany 23-26 June. WHO/CSR/APH/98.8. **Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC)**. Report of a World Health Organization Department of Communicable Disease Surveillance and Response. <http://www.who.int/emc>

WIELER, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: Association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2980-2984, 1996.

WILLERS, H. C.; KARAMANLIS, X. N.; SCHULTE, D. D. Potential of closed water systems on dairy farms. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 113-119, 1999.

WILLSHAW, G. A. et al. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxin-producing strain of *E. coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 897-902, 1994.

WILSON, J. B. et al. Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 174, p. 1021–1027, 1996.

WONG, C. S. et al. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, p. 1930-1936, 2000.

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