



UnB – Universidade de Brasília

FAV – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Thiago da Silva Medeiros

Pesquisa de *Escherichia coli* em carcaças de bovinos oriundos de abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal e Goiás

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Brasília, DF

2013

**Pesquisa de *Escherichia coli* em carcaças de
bovinos oriundos de abatedouros frigoríficos
localizados no Distrito Federal e Goiás**

Monografia apresentada para a conclusão
do Curso de Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a Doutora Angela Patrícia Santana

Brasília, DF

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MEDEIROS, Thiago da Silva

Título: Pesquisa de *Escherichia coli* em carcaças de bovinos oriundos de abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal e Goiás

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, sobretudo, aos meus pais, que confiaram em mim e me apoiaram no decorrer da minha graduação.

Aos colegas de laboratório, por suportar minhas insistentes e repetitivas perguntas, bem como pela sua orientação quando minha falta de experiência gerou algum obstáculo.

À minha namorada, que com compreensão e carinho, motivou-me em momentos de desânimo.

Por fim, agradeço também à minha orientadora, pela paciência, pelas oportunidades que me ofereceu e pelo conhecimento compartilhado.

RESUMO

MEDEIROS, T. S. Pesquisa de *Escherichia coli* em carcaças de bovinos oriundos de abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal e Goiás (*Escherichia coli* research in bovine carcasses' from slaughterhouses located in DF and Goiás). 2013. 27p. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. Este trabalho teve por objetivo detectar a presença da *Escherichia coli*, mais especificamente o sorotipo O157:H7, em meias-carcaças bovinas provenientes de abatedouros-frigoríficos situados no Distrito Federal e no Estado de Goiás. Para tanto, foram utilizados métodos de cultura, sorologia, testes bioquímicos e a reação em cadeia da polimerase, além da contagem microbiana deste microrganismo. Foram isoladas 15 cepas de *E. coli* a partir das 40 meias-carcaças bovinas analisadas (37,5%). No procedimento de contagem em placa, observou-se que das 40 amostras, apenas duas (5%) apresentaram colônias típicas, das quais obteve-se uma média de 100 UFC/cm². O sorotipo O157:H7 não foi detectado por nenhum dos métodos empregados. Estes resultados evidenciam que cuidados adicionais podem ser tomados durante a fase de abate, pois a contaminação de alimentos pelo microrganismo em questão pode indicar inadequação de medidas higiênico-sanitárias no processo de industrialização.

Palavras-chave: Meia-carcaça bovina, *Escherichia coli* O157:H7, qualidade, carne.

ABSTRACT

MEDEIROS, T. S. *Escherichia coli* research in bovine carcasses' from slaughterhouses located in DF and Goiás (Pesquisa de *Escherichia coli* em carcaças de bovinos oriundos de abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal e Goiás). 2013. 27p. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. This study aimed to detect the presence of *Escherichia coli*, more specifically the O157:H7 serotype, in beef half-carcasses from slaughterhouses-stores located in Distrito Federal and the State of Goiás. For this, methods of culture, serology, biochemical tests and the polymerase chain reaction were used, as well as the enumeration of this microorganism. 15 strains were isolated from *E. coli* from 40 beef half-carcasses analyzed (37.5%). In the plate count procedure, it was observed that only two of the 40 samples (5%), showed typical colonies from which it was obtained an average of 100 CFU/cm². Serotype O157:H7 was not detected by any of the methods employed. These results suggest that extra care can be taken during the slaughter, since food contamination by *E. coli* may indicate inadequate hygiene and sanitary measures in the industrialization process.

Keywords: Half-bovine carcass, *Escherichia coli* O157:H7, quality, meat.

Sumário

PARTE 1	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
Sistematização.....	2
Habitat e distribuição.....	4
Forma de contagem e cultivo	4
Características bioquímicas	6
Tipos de <i>Escherichia coli</i>	7
<i>Escherichia coli</i> em alimentos	9
PARTE 2	14
INTRODUÇÃO	14
MATERIAS E MÉTODOS	15
Realização da contagem de colônias típicas de <i>Escherichia coli</i>	16
Isolamento microbiológico da <i>E. coli</i>	16
Detecção do sorotipo O157:H7 por sorologia e pela reação em cadeia da polimerase.....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
Resultado da contagem de colônias típicas de <i>Escherichia coli</i>	18
Resultado do isolamento microbiológico da <i>E. coli</i>	19
Resultado da detecção do sorotipo O157:H7 por sorologia e pela reação em cadeia da polimerase	20
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

PARTE 1

INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas por agentes biológicos, químicos ou físicos, os quais adentram o organismo humano pela ingestão de alimentos ou água contaminada. Visto que DTAs dificilmente são notificadas de forma oficial, o perfil epidemiológico das DTAs no Brasil ainda é pouco conhecido, sendo que apenas alguns estados e municípios possuem estatísticas e levantamentos reais sobre os agentes etiológicos mais comuns, fatores contribuintes e alimentos mais frequentemente envolvidos (AMSON et al., 2006).

Entre os patógenos veiculados por alimentos e causadores das DTAs, a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) tem-se mostrado bastante importante, principalmente no que concerne produtos derivados de carne bovina (BERTÃO et al., 2007). Infecções por *Escherichia coli* shiga toxigênica tem sido cada mais relatadas por todo o mundo, sendo que entre as STEC, o sorotipo O157:H7 foi inicialmente associado com doenças enterohemorrágicas no início dos anos 80, causando sérios surtos e casos esporádicos de doenças (W.H.O., 1998). Em alguns casos, a infecção por STEC pode progredir para a síndrome hemolítico-urêmica (HUS), caracterizada pela falência renal, ou para a púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), sendo possível o envolvimento do sistema nervoso central. O principal reservatório de STEC é o gado bovino, geralmente saudável, apesar destas cepas também terem sido isoladas de outros animais domésticos como cães, gatos, ovelhas, cabras e suínos (BERTÃO et al., 2007).

Ainda segundo Bertão et al., (2007), a produção de uma ou mais toxinas Shiga (principais marcadores de virulência das cepas STEC), isoladamente, não é suficiente para causar doenças, sendo outros fatores de virulência considerados relevantes. Entre esses fatores está a presença do plasmídeo pO157, responsável pelo fenótipo hemolítico característico da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), além de estar relacionado a produção de potenciais fatores de aderência (SILVA, 2004). Dessa forma, EHEC indica um

subgrupo da classe STEC, formado por bactérias patogênicas cujo principal representante é o sorotipo O157, acompanhado por outros que também tem sido associados a manifestações clínicas graves, como o O111:H8/NM, o O26:H11, o O103:H2 e o O113: H21 (SILVA, 2004).

Segundo Silva, (2004) existem três principais métodos para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos: os métodos imunológicos, disponíveis comercialmente na forma de kits, os métodos culturais clássicos, com várias etapas de subcultura, e os métodos moleculares, especialmente os baseados na reação de polimerase em cadeia (PCR).

Levando-se em consideração a importância deste microrganismo em carnes, este trabalho teve por objetivo realizar a pesquisa de *E. coli* em miúdos bovinos, avaliando assim a possibilidade de contaminação da carne por esta bactéria e pesquisar especificamente o sorotipo O157:H7.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sistematização

É possível classificar a *E. coli* como integrante do domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria e ordem Enterobacteriales (GARRITY et al., 2004). Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. albertii* e a *E. adecarboxylata*. e *E. coli*, sendo esta última a de maior importância prática, englobando grande número de grupos e tipos sorológicos. Estes sorogrupos são definidos através de seus antígenos O, K e H, apesar de nem sempre apresentar estes 3 antígenos simultaneamente, ou seja, pode-se ter sorotipos O:K:H, simplesmente O:H, ou ainda, em caso de amostras imóveis (sem antígenos flagelares), designar o sorotipo como, por exemplo, O157:H-, onde o "-" significa a ausência de flagelos (TRABULSI et al., 1998; GARRITY et al., 2004).

A *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo, curto, não esporulado, que usualmente se move por flagelos peritríquios, além de ser anaeróbio facultativo (SUSSMAN, 1997). Compreende um grupo de bactérias em

constante evolução que incluem tanto cepas patogênicas quanto comensais. A diversidade patogênica da *E. coli* resulta da inserção e deleção de genes, que determinam diferentes propriedades de virulência para cada isolado bacteriano e apenas as combinações mais bem sucedidas perduraram e se tornaram patótipos específicos de *E. coli* (WILLIAMS et al., 2010).

O Quadro 1 mostra, simplificada, alguns dos sorogrupos e sorotipos causadores de infecções.

Quadro 1. Sorotipos e sorogrupos mais frequentemente associados às infecções por *E. coli*.

Tipo de infecção	Sorogrupos e sorotipos mais comuns	Grupo
Intestinal (os sintomas variam)	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20,	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)
	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)
	O28:H, O112ac:H-, O133:H-, O152:H-, O164:H-, O167:H-	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)
	O55, O86, O142, O111:H-, O127	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)
	O44:H18	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)
	O126:H27	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)
Urinária	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O22, O25, O62, O75	Membros da flora normal dos intestinos
Meningite do recém-nascido	O1, O6, O7, O16, O18, O83	

Bacteremia	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O18, O22, O25, O76	Membros da flora normal dos intestinos
------------	--	---

Adaptada de TRABULSI et al., 1998 e RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002

De acordo com Murray et al., (2009) a eficiência da *E. coli* como um patógeno se deve ao fato de ser: o bacilo Gram negativo mais comumente isolado em pacientes com sepse (até 45% dos casos); responsável por mais de 80% e todas as infecções de trato urinário adquiridas na comunidade, além de provocar muitas infecções hospitalares; e por ser uma causa relevante de gastroenterite em países em desenvolvimento.

Habitat e distribuição

Assim como outras bactérias dentro da família *Enterobacteriaceae*, a *Escherichia coli* está distribuída mundialmente e faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos e animais (CARTER, 1988). Depois de expelida, pode ser encontrada na água, no solo, em resíduos, ou qualquer outro local que possa alcançar a partir de seu habitat primário, normalmente por contaminação fecal (SUSSMAN, 1997; BERG, 2004). Uma amostra típica de fezes pode conter 10^{11} (100 bilhões) de bactérias por centímetro cúbico (cm^3), podendo a *E. coli* responder por 10^9 (1 bilhão) destas (BERG, 2004).

Forma de contagem e cultivo

Apesar de existirem vários outros métodos para a contagem de coliformes e *E. coli*, o método convencional se baseia no método estatístico conhecido como Número Mais Provável, ou NMP (FENG et al., 2002).

O teste, chamado de NMP “completo” para *E. coli*, inicia-se a partir das culturas em caldo lauril triptose (LST), que é usado como teste presuntivo para coliformes. Geralmente, para este teste presuntivo em alimentos, são usadas 3 replicatas e 3 diluições, totalizando 9 tubos de LST. Para cada uma das 3 replicatas, deve-se inocular 1 mL das diluições previamente preparadas: 1:10 (10^{-1}); 1:100 (10^{-2}) e 1:1000 (10^{-3}). Estes tubos são então encubados a $35^\circ \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 e $48 \pm 2\text{h}$. Após o período de 24 horas, os tubos são examinados para verificar se houve produção de gás e para isso deve-se observar o tubo

de Durham (que por estar invertido acumulará a possível formação de gás) e agitá-los levemente (efervescência também é avaliada). Tubos negativos são incubados novamente e reavaliados após outras 24 horas (APHA, 2001).

Uma alçada de cada tubo positivo de LST deve então ser transferido para um tubo de caldo *E. coli* (EC) e encubado em banho com água circulante a $45,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Aqueles tubos de EC onde houve formação de gás (positivos) dentro do período entre 24 e 48 horas $\pm 2\text{h}$ serão contabilizados e avaliados pela tabela NMP própria para o alimento em questão (tabela 1). O resultado é expresso em NMP/g ou NMP/mL (APHA, 2001; FENG et al., 2002).

Tabela 1. MNP em 3 tubos para cada diluição decimal (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Tubos positivos			MPN/g ou mL	Tubos positivos			MPN/g ou mL
0.10	0.01	0.001		0.10	0.01	0.001	
0	0	0	<3.0	2	2	0	21
0	0	1	3.0	2	2	1	28
0	1	0	3.0	2	2	2	35
0	1	1	6.1	2	3	0	29
0	2	0	6.2	2	3	1	36
0	3	0	9.4	3	0	0	23
1	0	0	3.6	3	0	1	38
1	0	1	7.2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7.4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9.2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

Adaptada de BLODGETT, 2010.

Todos os tubos positivos no caldo EC devem ter seu conteúdo estriado no ágar Levine eosina azul de metileno (L-EMB) e encubado por intervalo de 18 a 24 horas a 35°C para que posteriormente seja feita a confirmação. As colônias com centro escuro, providas ou desprovidas de brilho metálico são indicativas de *E. coli*. (APHA, 2001; FENG et al., 2002). Então, devem ser transferidas 5 colônias suspeitas do L-EMB para o ágar padrão para contagem e incubadas por 18-24 horas a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A identificação de qualquer uma

das 5 colônias como *E. coli* é suficiente para avaliar os tubos EC como positivos. A partir desse ponto a confirmação é feita através das reações bioquímicas IMViC (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato), onde os padrões ++- (biótipo 1) e -+- (biótipo 2) são considerados positivos. Apenas bastonetes gram-negativos, não esporulados e produtores de gás em razão da fermentação da lactose devem ser avaliados. Uma alternativa adequado ao teste IMViC, é o uso de “kits” bioquímicos, como o API20E ou o VITEK (FENG et al., 2002).

Alguns métodos de cultivo são particularmente importantes para o isolamento das cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica. Um destes métodos culturais envolve as seguintes etapas: (1) Enriquecimento seletivo no caldo de Enriquecimento para *E. coli* enterohemorrágica (EHEC-EB), que é formado pela adição de cefixima, cefsulodina e vancomicina ao Caldo Tripticase de Soja; (2) Triagem das cepas sorbitol negativas por meio de plaqueamento diferencial no Ágar MacConkey Sorbitol Telurito Cefixima (TC-SMAC); (3) Confirmação preliminar das colônias obtidas na etapa anterior por meio do teste do indol e da produção da enzima β -glicuronidase, além de observação das características de crescimento no Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB); (4) Confirmação sorológica e bioquímica das culturas β -glicuronidase negativas e indol positivas no L-BEM através de testes sorológicos e testes bioquímicos no “kit” API20E; e (5) Testes moleculares com sondas genéticas ou PCR para verificação dos genes das shiga toxinas stx_1 e stx_2 (FENG & WEAGANT, 2002 apud SILVA et al., 2010).

Características bioquímicas

A caracterização da *E. coli* trará os seguintes resultados bioquímicos: catalase positivo; oxidase negativo; fermentação de açúcares com produção de gás (lactose positivo, glicose positivo, sacarose variável, fenilalanina negativo, maltose positivo); urease negativo; indol positivo; vermelho de metila positivo; Voges-Proskauer negativo; citrato negativo (OLIVEIRA, 2000 apud FORTES, 2008). Estes quatro últimos resultados (padrão ++-) correspondem ao biótipo 1 do teste IMViC (FENG et al., 2002).

O perfil bioquímico da *Escherichia coli* comum, por outro lado, possui algumas divergências pontuais quando comparado ao àquele observado no sorotipo O157:H7. Alguns destes estão expostos na quadro 2, adaptado de SILVA et al., (2010).

Segundo Haldane et al., (1986), algumas das provas bioquímicas mais relevantes e úteis para a identificação (inclusive para pequenos laboratórios) do sorotipo O157:H7 são a fermentação do sorbitol, e a descarboxilação da ornitina e da lisina, pois o percentual de cepas positivas para estes testes diferem significativamente entre a *E. coli* O157:H7 e a *E. coli* comum e sua inclusão aumenta a especificidade dos testes.

Quadro 2. Porcentagens positivas para cada teste em cepas de *E. coli* sorotipo O157:H7 comparadas com as demais cepas de *E. coli*.

Teste	<i>E. coli</i> O157:H7 (%)	<i>Escherichia coli</i> (%)
B-glicuronidase	0	96
Sorbitol	0	94
Salicina	0	40
Esculina	0	35
Arginina	0	17
Urease	0	1
Citrato	0	1
Sacarose	87	50
Indol	100	98
Lisina	100	90
Ornitina	100	65
Rafinose	100	50
Dulcitol	100	60

Tipos de *Escherichia coli*

Segundo Murray et al., (2009) as cepas de *E. coli* causadoras de gastroenterites podem ser divididas em 5 principais grupos: enteroagregativa, enterohemorrágica, enteroinvasiva, enteropatogênica e enterotoxigênica. Há ainda estudos que adicionam um sexto grupo, o das *E. coli* de aderência difusa (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; SILVA, 2004).

Associada com diarreia crônica e crescimento retardado em crianças, a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) está envolvida em casos de diarreia aquosa persistente em países pobres provocando também desidratação, apesar de haverem também surtos descritos em países desenvolvidos (MURRAY et al., 2009). Nesta enfermidade, as bactérias se autoaglutinam, em um arranjo de “tijolos empilhados”, que é mediado pela fímbria de aderência agregativa I (AAF/I), além de produzir toxinas que induzem a secreção de fluidos.

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), também chamadas de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou shigatoxigênica (STEC), compreende as cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, que são toxinas semelhantes àquela produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I e estão associadas à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades, incluindo, entre seus exemplares, a *E. coli* O157:H7 (SILVA, 2004). Quanto afetando crianças menores de 10 anos e não tratada, pode resultar em uma seqüela grave, chama de síndrome hemolítica-urêmica (HUS), marcada por falha renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (MURRAY et al., 2009). Outra complicação das infecções causadas pelas cepas EHEC é a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), que embora mais rara, inclui todas as características da HUS, apesar do envolvimento neurológico ser mais claro e dano renal menos grave (SILVA, 2004).

As cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) são pouco frequentes e causam infecção intestinal semelhante à causada por *Shigella* e sua invasão às células do cólon é está relacionada a genes plasmidiais. Uma vez dentro da célula, estas bactérias lisam vacúolos fagocíticos e se multiplicam, causando destruição celular que, juntamente com o processo inflamatório, pode causar ulceração do cólon (MURRAY et al., 2009).

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento e diferentemente da ETEC, sua transmissão dá-se de pessoa a pessoa, podendo provocar diarreia grave e crônica (MURRAY et al., 2009). Uma vez ligada às células do intestino delgado, a bactéria causa lesão do tipo adesão/obliteração (A/E), resultando na destruição

das estruturas das microvilosidades e, por consequência, má absorção e diarreia (MURRAY et al., 2009).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), adquirida através do consumo de água e alimentos contaminados com fezes, é mais comum em países em desenvolvimento, sendo observada em viajantes que visitam esses locais, além de causar diarreia infantil. A patogênese é mediada principalmente por duas classes de enterotoxinas; as termolábeis (LT-I e LT-II) e as termoestáveis (STa e STb), sendo que os genes para a STa e para a LT-I estão contidas num plasmídeo transferível, que também é possível carreador de adesinas. Estes fatores são responsáveis por estimular a hipersecreção de fluidos e eletrólitos, causando diarreia aquosa, cólicas, vômitos, náusea e febra baixa (MURRAY et al., 2009).

As cepas de *E. coli* de aderência difusa (DAEC) causam diarreia aquosa em crianças entre 1 e 5 anos de idade e possuem, como fatores de patogenicidade, uma fímbria de aderência (conhecidas como F1845), e uma proteína da membrana externa, ambos identificados em uma cepa do sorotipo O126:H27 (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; SILVA, 2004).

***Escherichia coli* em alimentos**

As doenças causadas por contaminantes biológicos presentes na água e nos alimentos são problemas de saúde pública comuns no Brasil e para avaliar as condições higiênicas de alimentos e da água, microrganismos indicadores são comumente utilizados. A presença de bactérias gram-negativas, por exemplo, é um indicativo de inadequados tratamentos térmicos ou de uma provável contaminação subsequente. A *E. coli* é o microrganismo de escolha como indicador de contaminação fecal, uma vez que é de fácil isolamento nos meios de cultura convencional e mais resistente por um período de tempo maior (SOUSA, 2006).

As cepas de *E. coli* enterohemorrágica também fazem parte dos contaminantes que podem ser encontrados em alimentos, provocando doenças em países desenvolvidos frequentemente. Estima-se que 73 mil infecções e 60 mortes por ano nos EUA sejam causadas por estas cepas. Apresenta alta

incidência em crianças menores de 5 anos de idade e ocorre mais frequentemente nos meses quentes, podendo a ingestão de menos de 100 bactérias causar a doença. A maioria destas infecções está relacionada ao consumo de carne moída mal cozida ou de outros produtos derivados da carne, além de água, leite cru, vegetais mal cozidos e frutas (MURRAY et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª Ed. Washington, DC, 2001. 676 p.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, M. L .; MASSSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (dtas) no estado do paraná –Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciências agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v30n6/a16v30n6.pdf>>. Acesso em: 05 mai. 2013.

BERG, H. C. *E. coli* in motion. 1ª Ed. Nova York: Springer-Verlag, 2004. 133 p.

BERTÃO, A. M. S.; Saridakis, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007. Disponível em: <http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_28_2_20_22.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2013.

BLODGETT, R. Most Probable Number from Serial Dilutions. *In*: **Bacteriological Analytical Manual**, Apêndice 2, out. 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tab1>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

CARTER, G. R. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. 1ª Ed. São Paulo: Roca, 1988. 249 p.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *In*: **Bacteriological Analytical Manual**, Capítulo 4, set. 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

FORTES, F. B. B. Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13401/000648131.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology. 2ª Ed. New York: Springer, 2004. 399 p.

HALDANE, D. J. M.; DAMM, M. A. S.; ANDERSON, J. M. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for vero (shiga-like) toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 24, n. 4, p. 652-653, out.1986.

JARDIM, Fernanda B.B.; SILVA, E. N.; OKURA, M.H.; RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 2, jun. 2006 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000200008&script=sci_arttext>. Acesso em: 09 abr. 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948 p.

RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R. et al., Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 2006-2012, out. 1988.

RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Publica**, Mexico, v. 44, p. 464-475, 2002. Disponível em: <<http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000363>>. Acesso em: 04 jun. 2013.

SILVA, N. *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. 2004. 106f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 4ª Ed. São Paulo: LivrariaVarela, 2010. 623 p.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v .9, n. 1, p. 83-88, jan./jun. 2006.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli*: Mechanisms of virulence. 1ª Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 643 p.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO. M. R. F. Microbiologia. 2ª Ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1998. 386 p.

W.H.O., 1998. **WHO/CSR/APH/98.8**. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany, 23-26 June 1998. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CSR_APH_98.8.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2013.

WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America, University of Texas: Bentham Science Publishers Ltd., p. 8-24, 2010.

PARTE 2

INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* é o mais importante e mais comum membro do gênero *Escherichia*, estando associado a uma grande variedade de doenças. Ainda dentro desta espécie, há sorotipos como a *E. coli* O157:H7, que representa, entre outras afecções, a causa mais comum de colite hemorrágica (MURRAY et al., 2009). O trato intestinal de ovinos e bovinos parece atuar como o principal reservatório das cepas enterro-hemorrágicas de *E. coli* O157:H7, de modo que no momento do abate, o contato de vísceras com a carne, utensílios e equipamento pode resultar em contaminação (SILVA et al., 2010).

Enfermidades causadas por *E. coli* O157:H7 já foram relatadas em 6 continentes, abrangendo mais de 30 países. Apenas nos EUA, este microrganismo responde, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), por 2168 hospitalizações e 61 mortes anualmente (RAHAL et al., 2012). Estima-se ainda que seja responsável por 350 surtos ocorridos nos EUA em um período de 20 anos (RANGEL et al., 2005; RAHAL et al., 2012). As doenças que este patógeno pode causar são consideradas um grande perigo, podendo incorrer em sequelas graves e crônicas. As mais graves são a síndrome hemolítico-urêmica (HUS) e a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), que tem como sintomatologia comum, a anemia, trombocitopenia e distúrbios do sistema nervoso, podendo inclusive ser letal (SILVA et al., 2010).

Grande parte das infecções é atribuída ao consumo de carne bovina mal cozida e outros produtos derivados da carne, além de leite não pasteurizado, vegetais, molhos preparados para saladas, maionese e outros (MURRAY et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Sabendo-se da importância desta bactéria, e especialmente do sorotipo O157:H7, para a saúde pública, e levando em consideração as consequências advindas do consumo de alimentos por ela contaminados, este trabalho teve por objetivo verificar se a *Escherichia coli*, mais especificamente o sorotipo O157:H7, está ou não presente nas amostras obtidas de meias-carcaças

bovinas oriundas de abatedouros frigoríficos localizados na região do Distrito Federal e de Goiás.

MATERIAS E MÉTODOS

A coleta de amostras foi feita a partir de meias carcaças bovinas provenientes de 3 abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal e Goiás no período entre agosto de 2012 e fevereiro de 2013, totalizando 40 meias-carcaças. Foram 10 amostras coletadas de um abatedouro no Goiás e 30 coletadas em 2 abatedouros do DF, sendo 10 destas no primeiro e 20 no segundo. A unidade amostral foi composta por 5 pontos distintos da meia carcaça, distribuídos uniformemente. Nestes pontos foram posicionados moldes esterilizados de 10cm² (figura 1) para delimitar a área de aplicação dos *swabs* pela técnica do esfregaço de superfície, semelhantemente ao trabalho de Jardim et al., (2006). Com exceção das 4 últimas meias carcaças, onde a coleta ocorreu após a fase de lavagem, todas as amostras foram obtidas imediatamente após a fase de serragem da carcaça.

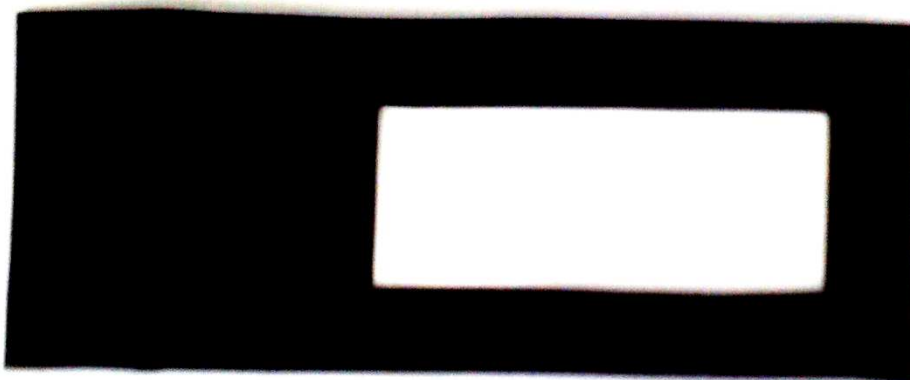


Figura 1: Molde de 10 cm² (2 cm x 5 cm) utilizado nas coletas

Após a coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Brasília, em tempo não superior a duas horas, onde foram colocados em frasco de Erlenmeyer, contendo 25mL de água peptonada tamponada a 1%. O conteúdo deste frasco foi homogeneizado com o auxílio de um agitador (Vortex), e posteriormente submetidos aos procedimentos necessários à contagem bacteriana, isolamento e identificação descritos adiante.

Uma vez que cada *swab* abrangeu uma área de 10cm² e que, em cada carcaça foram aplicados 5 destes, num total de 50cm², a imersão nos 25mL proporcionou uma relação área/volume (50cm²/25mL) de 2cm²/mL.

A partir deste ponto o trabalho consistiu basicamente de 3 etapas: contagem, isolamento de colônias de *Escherichia coli* e tipificação, na tentativa de detectar o sorotipo O157:H7 (através de sorologia e reação de polimerase em cadeia).

Realização da contagem de colônias típicas de *Escherichia coli*

Nas primeiras 10 amostras, após a homogeneização do conteúdo do frasco de Erlenmeyer, foram preparadas as diluições 1:10 (10⁻¹) e 1:100 (10⁻²), e, 1 ml destas foi aplicado sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), as quais foram incubadas a 35° C por 24 horas. Decorrido este tempo, foram então contadas as colônias típicas de *E. coli* (escuras, com brilho verde metálico). Nos casos onde as 24 horas foram insuficientes para o crescimento de colônias bacterianas, houve nova incubação por outras 24 horas. Nas 30 amostras seguintes, apenas 0,1 ml das diluições foi aplicado nas placas, e a diluição 1:100 deixou de ser usada. A mudança no protocolo usado para a contagem deveu-se aos resultados obtidos nas primeiras 10 amostras, onde não houve crescimento bacteriano.

Isolamento microbiológico da *E. coli*

Esta etapa foi uma adaptação simplificada do método cultural proposta por Silva et al., (2010). Uma vez feitos os procedimentos necessários à contagem, o frasco Erlenmeyer também foi incubado a 35° C por 24 horas, como forma de enriquecimento cultural, período após o qual uma alçada do seu conteúdo foi estriado no meio ágar MacConkey, que foi incubado a 35° C por outras 24 horas. Colônias avaliadas como suspeitas (figura 2) foram estriadas em ágar Levine eosina azul de metileno (L-EMB), onde as colônias da *E. coli* são facilmente identificáveis, e incubadas à 35° C por 24 horas. Uma vez

isoladas, cada amostra passou pelos seguintes testes bioquímicos: Sacarose, urease, citrato, VM/VP, fenilalanina, TSI, sorbitol, ornitina, lisina e indol.

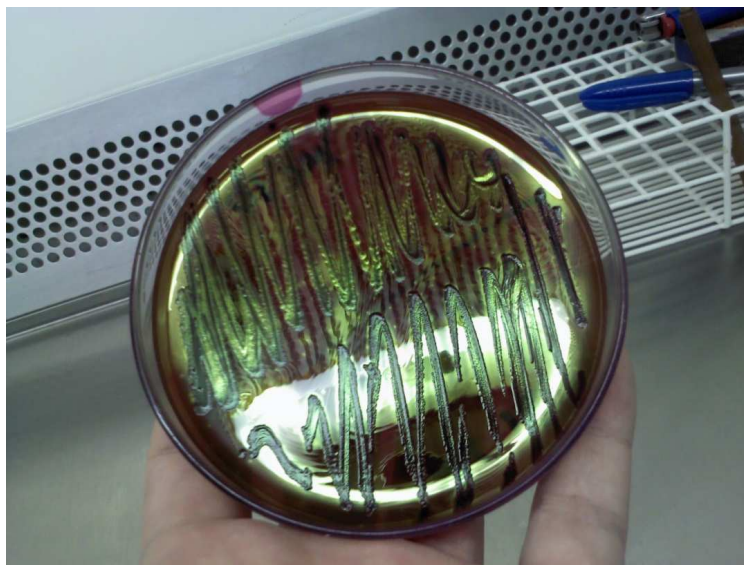


Figura 2: Cultura suspeita (escuras e apresentando brilho verde metálico) de *Escherichia coli* em L-BEM.

Detecção do sorotipo O157:H7 por sorologia e pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para avaliar se as cepas de *Escherichia coli* isoladas pertenciam ao sorotipo O157:H7, utilizou-se o antissoro somático O157 (Probac do Brasil®). Para a realização da reação em cadeia da polimerase, foi utilizada a sequência de oligonucleotídeos 5' GCGAAACTGTGGAATTGGG 3' (forward) e 5' TGATGCTCCATAACTTCCTG 3' (reverse) que correspondem ao *UidA* e 5' AGCTGCAAGTGCGGGTCTG 3' (forward) e 5' TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC 3' (reverse) que correspondem ao *HlyA*, codificando, respectivamente, o gene da β -glicuronidase e o gene da enterohemolisina presente no plasmídeo pO157. A reação da PCR foi realizada de acordo com as seguintes condições, para um volume final de 25 μ l: 2,5 μ l de Buffer 10x; 2mM MgCl₂; 1 μ l do primer (forward); 1 μ l do primer (reverse); 1 μ l de *Taq*; 2,5 μ l de dNTP. Para o grupo de primers correspondentes ao *HlyA*, as amostras passaram por uma desnaturação inicial por 8min na temperatura de 95°C, seguidas de 30 ciclos de amplificação com desnaturação à 95°C por 30s, anelamento a 58°C por 30s e extensão à 72°C por 30s, terminando em uma etapa de extensão final à 72°C

por 7min. Já no caso do *UidA*, foi utilizada a técnica do “hot-start” e então seguiu-se com a amplificação por 35 ciclos, consistindo de 1,5 min a 94°C para a desnaturação, 1,5min a 64°C para o anelamento e 1,5min a 72°C para extensão, conforme os trabalhos de Wang et al., (2002) para o *hlyA* e de Cebula et al., (1995) para o *uidA*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultado da contagem de colônias típicas de *Escherichia coli*

Na contagem de *E. coli*, observou-se que das 40 meias-carcaças analisadas, apenas duas (5%) apresentaram contagem de colônias típicas de *E. coli* no meio de L-EMB, sendo o valor de $1,5 \times 10^2$ UFC/cm² em uma placa e 5×10^1 UFC/cm² em outra, resultando em uma média de 100 UFC/cm². Esses resultados foram superiores aos observados por Casagrande et al., (2013) nas contagens de meias-carcaças bovinas, em que estes autores verificaram a contagem média de $4,08 \pm 11,67$ UFC/cm², entretanto estes autores utilizaram para contagem a técnica do Petrifilm™, e o número de amostras, 1111, foi significativamente maior que as amostras deste estudo. Os resultados do presente estudo foram também superiores aos verificados por Bohaychuk et al., (2011) na contagem de *E. coli* feita a partir de 1018 carcaças bovinas, encontrou médias de 0,3 UFC/cm² em frigoríficos com pequeno volume de abate e 0,6 UFC/cm² em frigoríficos com grande volume de abate. Estes mesmo autores utilizaram para o procedimento de contagem o meio ágar vermelho violeta bile (VRBA), adicionado de MUG (4-metilumbeliferil β-D-glicurónídeo) e a confirmação da *E. coli* foi feita pela observação de fluorescência e produção de gás em meio EC médio adicionado de MUG.

Apesar do ágar L-EMB ter se provado bom para a pesquisa de *E. coli*, é provável que o plaqueamento em superfície neste meio não tenha sido a melhor escolha para o procedimento de contagem, pois não houve um etapa de pré-enriquecimento, comumente utilizada em outras trabalhos. Nesse sentido, um método que envolvesse uma etapa de enriquecimento, como o

método do Número Mais Provável (NMP), conforme descrito por Feng et al., (2002) poderia ser uma alternativa para a o processo de contagem. Este mesmo autor cita ainda o método de contagem em placa, utilizando o ágar bile vermelho violeta (VRBA), mas mesmo este método utiliza como etapa prévia, o enriquecimento em caldo lauril triptose (LST), utilizado na primeira etapa do método NMP mencionado anteriormente.

Resultado do isolamento microbiológico da *E. coli*

Na pesquisa de *Escherichia coli* nas 40 amostras de meias carcaças bovinas, o microrganismo foi isolado em 15 (37,5%) das amostras analisadas. Outras provas bioquímicas foram usadas para a identificação do sorotipo O157:H7 e os resultados obtidos foram: lisina positivo; ornitina positivo; sacarose positivo e sorbitol positivo (figura 3), tornando quase nula a probabilidade das amostras pertencerem ao referido sorotipo, pois as cepas isoladas não apresentaram o teste do sorbitol negativo como resultado, o que é característico do sorotipo em questão. Houve ainda uma única amostra negativa para o teste da ornitina, resultado este que também difere do esperado para o sorotipo alvo da pesquisa.



Figura 3: Amostras positivas no teste do sorbitol. O tubo à direita é um controle negativo.

O resultado do isolamento da *E. coli* observado neste estudo, foi superior ao encontrado por Casagrande et al., (2013) onde a ocorrência da *E. coli* limitou-se a 4,4% das amostras analisadas a partir de meias-carcaças bovinas, oriundas de um abatedouro-frigorífico sob inspeção federal localizado no município de Tangará da Serra, no estado de Mato Grosso. O resultado obtido por Bohaychuk et al., (2011) em que *E. coli* foi encontrada em 14.6% das amostras obtidas a partir de carcaça bovina provenientes de abatedouros inspecionados em Alberta, no Canadá, também foi inferior ao observado neste estudo. Hauge et al., (2010) analisaram amostras obtidas de carcaças de bovinos e cordeiros em 3 abatedouros comerciais na Noruega e detectaram o microrganismo em 46% das amostras, valor superior ao encontrado no presente trabalho.

Apesar número de amostras analisadas neste estudo ser pequeno, considerando a extensão das regiões produtoras de carne bovina do Estado de Goiás e do Distrito Federal, que de acordo com o IBGE, (2011) possuem população total de bovinos próxima a 21.744.650 e 98.000 cabeças, respectivamente, os dados obtidos neste estudo são importantes por contribuir com informações a respeito da *Escherichia coli* neste tipo de produto de origem animal, podendo ser úteis em trabalhos futuros.

Resultado da detecção do sorotipo O157:H7 por sorologia e pela reação em cadeia da polimerase

Todas as 15 amostras identificadas através das provas bioquímicas, como cepas de *E. coli*, foram submetidas ao teste do antissoro somático O157 (Probac do Brasil®), tendo como resultado a não aglutinação em todas as cepas analisadas. Apesar da incapacidade de fermentar o sorbitol ser uma característica fenotípica usada para identificar o sorotipo O157:H7, o teste do antissoro O157 não pôde ser desprezado, pois há trabalhos que relatam cepas sorbitol positivas da *Escherichia coli* O157:H7 e, por isso, esse método auxilia na detecção deste sorotipo confirmando os resultados obtidos pelas provas bioquímicas (CEBULA et al., 1995).

Fez-se a PCR para a detecção de fragmento dos genes *uidA* e *hlyA* (que codificam, respectivamente, o gene da β -glicuronidase e o gene da enterohemolisina presente no plasmídeo pO157), tendo como resultado a reação negativa para todas as cepas analisadas. É importante destacar que essas duas reações da PCR auxiliam na identificação do sorotipo O157:H7, apesar de nenhuma delas ser exclusiva da *E. coli* O157:H7. O *hlyA*, por exemplo, também pode estar presente nos sorotipos O111:NM, O93:H19, O26:H11 (VAZ et al., 2004) enquanto o *uidA* está presente no sorotipo O157:H- (Al-Ajmi et al., 2006). A combinação de várias sequências gênicas aumentaria a especificidade do ensaio para detecção do sorotipo específico, sendo ideal que uma ou mais delas fossem exclusivas do sorotipo pesquisado, de forma que o diagnóstico seja definitivo.

Os resultados obtidos na detecção específica do sorotipo O157:H7 foram semelhantes com aqueles encontrados por Silva et al., (2001) e Silva et al., (2003) que não constataram a presença da *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. Em contrapartida, Bastos et al., (2006) apresenta um compilado de relatos sobre a detecção do sorotipo O157:H7 no Brasil e na América Latina, inclusive em alimentos, provando que há esta possibilidade.

Ademais, a presença do sorogrupo O157 já foi identificado em gado de leite provenientes de propriedades no Rio Grande do Sul (SANDRINI et al., 2007) e isolado de pacientes com diarreia nos estados de São Paulo (IRINO et al., 2002). Outro estudo, realizado na Bahia, isolou várias cepas de *Escherichia coli* shiga toxigênica em crianças (BUERIS et al., 2007).

Apesar do isolamento da *Escherichia coli*, a presença do sorotipo O157:H7 desta bactéria não foi detectada. Os resultados obtidos não se constituem de evidências suficientes sólidas para afirmar que as cepas de *E. coli* enterohemorrágica estão ausentes nas meias-carcaças utilizadas na elaboração de produtos de origem animal no Distrito Federal e no estado de Goiás, mas traz provas de que as práticas higiênico-sanitárias na cadeia de produção de alimentos não devem ser negligenciadas e que os cuidados quanto à contaminações de origem fecal podem ser ainda maiores.

Dados coletados em outras etapas do abate ou mesmo da cadeia produtiva e com um maior número de amostras poderiam fornecer dados mais abrangentes e precisos acerca da presença do patógeno em questão e sobre as precauções necessárias para evitar sua disseminação. Há de se pensar ainda na coleta de amostras a partir de fezes bovinas e de produtos cárneos industrializados como uma fonte relevante de dados, visto que a *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 já foi encontrada nestes materiais por outros pesquisadores, como Silva, (2002) que detectou este patógeno em uma amostra fecal de bovino em Ponta Grossa, no Paraná e Radu et al., (1998) que isolou 12 cepas de O157:H7 a partir de amostras de carne bovina comercializadas na Malásia.

Vale ainda ressaltar que a utilização de métodos culturais, imunológicos e moleculares de detecção já utilizados em outros trabalhos e consolidados no meio científico e laboratorial pode ser de fundamental importância para a identificação do microrganismo alvo, de forma rápida e eficiente, fazendo com que os resultados encontrados sejam verossímeis e condizentes com a real situação avaliada no experimento.

CONCLUSÃO

Foi evidenciada a presença da *Escherichia coli* em meias-carcaças bovinas procedentes de abatedouros frigoríficos estabelecidos no estado de Goiás e no Distrito Federal, ainda que o sorotipo O157:H7 não tenha sido detectado. Os resultados obtidos provam que cuidados adicionais podem ser tomados no campo das boas práticas de fabricação e mais estudos (inclusive com maior número de amostras) devem ser conduzidos para uma melhor avaliação da situação higiênico-sanitária desta cadeia produtiva, de forma a garantir a qualidade da carne bovina nestas localidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AJMI, D.; PADMANABHA, J.; DENMAN, S. E.; GILBERT, R. A.; AL JASSIM, R. A. M.; MCSWEENEY, C.S. Evaluation of a PCR detection method for *Escherichia coli* O157:H7/H- bovine faecal samples. **Lett Appl Microbiol.** V. 42 p. 386-91, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16599993>>. Acesso em 11 de abr. 2012.

BASTOS, F. C.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 89-97, out. 2006.

BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; BARRIOS, P. R. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 10, p. 1095-1100, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3174505/#!po=50.0000>>. Acesso em 25 de jun. 2013.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.7, p. 839-844, nov. 2007.

CASAGRANDE, L.; DETANICO, C. M. T.; FRANCO, R. M. Ocorrência de *Escherichia coli* em meias carcaças de bovinos abatidos em estabelecimento habilitado para exportação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.6, p.1025-1030, jun. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000600013&lang=pt>. Acesso em: 20 jun. 2013.

CEBULA, T. A., PAYNE, W. L., FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by

mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. **J Clin Microbiol.** V. 33, n. 1, p. 248–250, jan. 1995. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227922/pdf/330248.pdf>>.

Acesso em: 12 de abr. 2012.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *In: Bacteriological Analytical Manual*, Capítulo 4, set. 2002. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

HAUGE, S. J.; NESBAKKEN, T.; SKJERVE, E.; DOMMARSNES, K.; OSTENSVIK, O. Evaluation of the SimPlate method for enumeration of *Escherichia coli* in swab samples from beef and lamb carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p. 229-233, abr.-jun. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510003788>>.

Acesso em: 24 jun. 2013.

IBGE - Efetivo de bovinos em 31.12 e participações relativa e acumulada no efetivo total, segundo as Unidades da Federação e os 20 municípios com os maiores efetivos, em ordem decrescente. Produção da Pecuária Municipal, v.39, 2011. Disponível em:

<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab10.pdf>. Acesso em 27 jun. 2013.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M. A. M. F.; NAVES, Z. V. F.; LARA, R. R.; MARCO, M. E. C.; ROCHA, M. M. M.; MOREIRA, T. P.; GOMES, T. A. T.; GUTH, B. E. C. O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.4, p. 446-447, abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730246/>>. Acesso em: 25 jun. 2013.

JARDIM, F. B. B.; SILVA, E. N.; OKURA, M.H.; RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 2, jun. 2006 .

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cta/v26n2/30173.pdf>>. Acesso em: 09 abr. 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948 p.

RADU, S.; MUTALIB, S. A.; RUSUL, G.; AHMAD, Z.; MORIGAKI, T.; ASAI, N.; KIM, Y. B.; OKUDA, J.; NISHIBUCHI, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Marketed in Malaysia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 1153-1156, mat. 1998. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/64/3/1153.full.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2012.

RAHAL, E. A.; KAZZI, N.; NASSAR, F. J.; MATAR, G. M. *Escherichia coli* O157:H7—Clinical aspects and novel treatment approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 138, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498739/>> Acesso em: 18 jun. 2013.

RANGEL, J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11 n. 4, p. 603–609. Abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320345/>> Acesso em: 18 jun. 2013.

SANDRINI, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 1, jan-fev, 2007.

SILVA, L. R. Pesquisa de *Escherichia coli* 0157:h7 em bovinos abatidos em matadouro frigorífico de Curitiba – Paraná. 2002. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 4ª Ed. São Paulo: LivrariaVarela, 2010. 623 p.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; CONTRERAS, C.; BERAQUET, N. J.; YOKOYA, F.; NASCIMENTO, C. A.; OLIVEIRA, V. M.; TSE, C.L. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 2, p.223-227, maio-ago. 2001

SILVA, N. S.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, mai-ago. 2003.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; DIAS, Â. M. G.; GOMES, T. A. T.; MEDEIROS, M. I. C.; ROCHA, M. M. M.; GUTH, B. E. C. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999 **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 2, p. 903-905, fev. 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/42/2/903>> Acesso em: 22 de abril de 2013.

WANG, G. et al., Detection in *Escherichia coli* of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 10, p. 3613-3619, out. 2002. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/40/10/3613>>. Acesso em: 11 abr. 2012.