

ANDRESSA PINHEIRO GOMES

***Escherichia coli* SHIGA-TOXIGÊNICA (STEC) EM ABATEDOURO DE BOVINOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G633e
2008

Gomes, Andressa Pinheiro, 1977-
Escherichia coli Shiga-toxigênica (STEC) em abate-
douro de bovinos no Estado de Minas Gerais / Andressa
Pinheiro Gomes. – Viçosa, MG, 2008.
xvi, 46f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-42.

1. *Escherichia coli*. 2. Toxinas. 3. Bovino. 4. mata-
douros. 5. Bactérias patogênicas. 6. Reação em cadeia
de polimerase. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 579.342


ANDRESSA PINHEIRO GOMES

***Escherichia coli* SHIGA-TOXIGÊNICA (STEC) EM ABATEDOURO DE BOVINOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de outubro de 2008.


Prof.^a Magdala Alencar Teixeira
(Co-Orientadora)


Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-Orientador)


Prof.^a Maria Cristina Dantas Vanetti


Pesq. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto


Prof.^a Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

À Santíssima Trindade, presença e graças concedidas.

À Virgem Maria, presença e intercessão.

Aos meus pais Alberto e Ângela.

À minha vovó Jacyra (*in memoriam*).

A Hilda Simone e Padre Paulo, fontes de amizade e força.

À Professora Célia Alencar e ao Professor Arnaldo Chaer Borges.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de participar do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação, pelas sugestões, pelas críticas ao trabalho e, especialmente, pela paciência e amizade.

À Professora Magdala Alencar Teixeira, pelo incentivo, pela determinação e pela prestatividade.

Ao Professor Arnaldo Chaer Borges, pelos conselhos e pela motivação e ajuda.

À Professora Maria Aparecida Scatanburlo Moreira, pelo apoio e empenho.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelo importante auxílio e pelas sugestões.

À Pesquisadora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pela amizade, força, atenção e generosidade.

Ao Professor Abelardo da Silva Filho e Humberto, do Departamento de Veterinária, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Professor Nélio e Professora Regina, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelo apoio e pela confiança.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, pelo apoio e pela amizade.

À Professora Maria Catarina M. Kasuya, Marliane e ao Professor Marlon do Laboratório de Associações Micorrízicas, pelo importante auxílio.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética e de Microrganismos Guilherme e Leonardo, pelo companheirismo.

Aos meus amigos José Carlos e Marcelo, pela ajuda e pelo apoio.

Aos estagiários e meus amigos Alessandra e Eduardo, pela presença, fidelidade e eficiência.

Aos funcionários Sr. Toninho, Danilo, Evandro, Laura e Nilcéa, pela amizade, dedicação e eficiência.

Aos funcionários Marcos e Luís, do Departamento de Veterinária, pela amizade, pelo respeito, pelo auxílio e pela eficiência.

À querida Hilda Simone, pela amizade, pelo apoio e pela força.

Ao querido Padre Paulo Nobre, pela presença de Deus.

A Senhora Diva Mello de Alencar (*in memoriam*), pelo carinho e pela amizade.

Aos meus amigos Glauce, Thiago, Lígia, Grazy e Galvão, pela força.

À família Fraternidade Pequena Via, pela acolhida.

Aos meus familiares, pelo incentivo, pela força e pela paciência.

À minha querida Mãe, pela força, amizade e intercessão.

A Deus, pela vitória, por intermédio do Imaculado Coração de Maria.

BIOGRAFIA

ANDRESSA PINHEIRO GOMES, filha de Alberto Pinheiro Gomes e Ângela Maria Ribeiro Jannotti, nasceu em Furnas Centrais Elétricas S.A., Estado de Minas Gerais, no dia 11 de maio de 1977.

Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde, em outubro de 2002, graduou-se em Economia Doméstica.

Em agosto de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa da Dissertação em outubro de 2008.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Coleta de amostras no abatedouro.....	15
3.2. Detecção e isolamento de <i>Escherichia coli</i> Shiga toxigênica (STEC).....	16
3.3. Identificação Bioquímica: Teste IMViC.....	17
3.4. Identificação genotípica de STEC pela presença de <i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ e <i>hly</i>	17
3.4.1. Amplificação e análise do DNA por eletroforese.....	18
3.5. Seqüenciamento.....	18
3.6. Análise da citotoxicidade em Células Vero.....	18
3.6.1. Preparo das toxinas.....	18

	Página
3.6.2. Análise do potencial citotóxico das estirpes potencialmente shigatoxigênicas – STEC.....	19
3.7. Detecção de entero-hemolisina (Ehly)	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS.....	43
ANEXO 1	44
ANEXO 2	45
ANEXO 3	46

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Número de bovinos positivos para <i>Escherichia coli</i> isoladas em meio de enriquecimento seletivo, EC modificado – mEC com e sem Novobiocina	21
2. Número de bovinos positivos para <i>Escherichia coli</i> Shiga-toxigênica – STEC obtidas de enriquecimento seletivo, EC modificado – mEC com e sem Novobiocina	22
3. Características dos isolados potencialmente shigatoxigênicos.....	29

LISTA DE TABELAS

	Página
1A. Características dos isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes da pele bovina	44
2A. Características dos isolados de <i>E. coli</i> provenientes de fezes bovina.....	45
3A. Características dos isolados de <i>E. coli</i> provenientes de carcaça bovina.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Rotas de Transmissão	9
2. Estrutura de Análise de Riscos	11
3. Análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% de <i>stx</i> amplificado dos isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de Matadouro frigorífico.....	22
4. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Stx1 de <i>Escherichia coli</i> Shigatoxigênica isoladas de bovinos em linha de abate. Ec <i>stx1</i> – Subunidade A da toxina Stx1 de <i>Escherichia coli</i> linhagem EC120(número de acesso no GenBank: 193221234); F ₆ AN1, F ₆ AN2, F ₆ AN3, F ₆ AN4 - isolados proveniente de fezes	24
5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Stx2 de <i>Escherichia coli</i> Shigatoxigênica isoladas de bovinos em linha de abate. Ec Stx2 – subunidade A da toxina Stx2 de <i>Escherichia coli</i> linhagem EC112 (número de acesso no GenBank:193221201; F ₁ A4 – isolado proveniente de fezes; C ₁₀ B1, C ₁₀ B2 e C ₁₀ B3 – isolados provenientes das carcaças.....	25
6. Fotomicrografia do resultado do teste de Citotoxicidade, em células Vero, de isolados de <i>Escherichia coli</i> positivos para <i>stx1/stx2</i> , com aumento de 40x. A - branco;B- controle positivo; C, D, E - Presença de Efeito citotóxico; F, G,H - Ausência de efeito citotóxico.....	26

	Página
6. Fotomicrografia do resultado do teste de Citotoxicidade, em células Vero, de isolados de <i>Escherichia coli</i> positivos para stx1/stx2, com aumento de 40x. I, J, K - Presença de Efeito citotóxico; L, M, N, O, P - Ausência de efeito citotóxico	27
6. Fotomicrografia do resultado do teste de Citotoxicidade, em células Vero, de isolados de <i>Escherichia coli</i> positivos para stx1/stx2, com aumento de 40x. Q, R, S, T - Presença de Efeito citotóxico	28
7. Análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% de <i>hlyA</i> amplificado dos isolados de STEC, provenientes de, Matadouro frigorífico.....	30
8. Atividade de entero-hemolisinas dos isolados C ₁₀ B2 e C ₁₀ B3; Controle positivo – C3388; Controle negativo <i>E. coli</i> K12	30

LISTA DE ABREVIATURAS

STEC – *Escherichia coli* Shiga-toxigênica

EHEC – Entero-hemorrágica

mEC – Caldo EC modificado

mECn – Caldo EC modificado acrescido de Novobiocina

SMAC – MacConkey Sorbitol

PCR – Reação em cadeia de polimerase

CH – Colite hemorrágica

SUH – Síndrome Urêmico Hemolítica

PTT – Púrpura trombocitopênica trombótica

Stx – Toxina tipo shiga

Ehly – Entero-hemolisina

LEE – Lócus de destruição de enterócitos (Ilha de patogenicidade)

RESUMO

GOMES, Andressa Pinheiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. ***Escherichia coli* Shiga-Toxigênica (STEC) em abatedouro de bovinos no Estado de Minas Gerais.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-Orientadores: Magdala Alencar Teixeira, Arnaldo Chaer Borges e Maria Aparecida Scatanburlo Moreira.

Escherichia coli Shiga-toxigênica, STEC, tem emergido como patógeno que pode causar infecções de origem alimentar e doenças severas e potencialmente fatais, como Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH). A maioria dos surtos de CH e SUH tem sido atribuída a estirpes do sorotipo entero-hemorrágico O157:H7, entretanto existe interesse crescente sobre o risco à saúde humana associado com os sorotipos STEC não-O157 veiculados em produtos de carne bovina, contaminados por fezes de ruminantes. Este trabalho teve como objetivos determinar a ocorrência de STEC em bovinos em matadouro frigorífico, localizado no Estado de Minas Gerais. A amostragem foi realizada em dois lotes, lote A com 75 bovinos e lote B com 51 bovinos, em três etapas da linha de abate: pele, após a sangria; carcaça, após a serragem; e fezes, durante a evisceração. Dez animais de cada lote foram amostrados. As amostras foram enriquecidas em caldo EC modificado, mEC e EC modificado acrescido de Novobiocina, mECn, seguindo-se o isolamento de

colônias típicas em meio MacConkey sorbitol. Duzentos e quarenta e um isolados bacterianos obtidos nos dois lotes foram identificados como *E. coli*. Desses, 104 foram provenientes da pele, 93 do material fecal e 44 das carcaças. Por reação em cadeia de polimerase, foi detectado o gene *stx* em 18 isolados de *E. coli*. Esses isolados foram provenientes de seis bovinos, sendo quatro do lote A (origem fecal) e dois do lote B (carcaça). O enriquecimento em meio mECn resultou em isolados originados de um bovino, enquanto no mEC os isolados se originaram de cinco bovinos. Os isolados *stx* positivos foram posteriormente analisados para o gene *hlyA*, codificador de entero-hemolisina. Quatro isolados, positivos para o gene *hlyA*, foram provenientes de dois bovinos, um do lote A (origem fecal) e outro do lote B (carcaça). Desses, dois isolados da carcaça apresentaram fenótipo entero-hemolítico. Dez dos 18 isolados potencialmente STEC demonstraram ter efeito citotóxico em células Vero. Oito isolados, provenientes de três bovinos distintos, tiveram os amplicons *stx* seqüenciados. As seqüências traduzidas de três isolados da carcaça e de um das fezes corresponderam a Stx2, com 98% a 99% de identidade, com referências no GeneBank (NCBI). As seqüências inferidas de quatro amplicons, de origem fecal, corresponderam, com 94% a 96% de identidade, a Stx1. A presença de STEC nas fezes e carcaça de bovinos em matadouro frigorífico no Estado de Minas Gerais enfatiza a importância de implementação do sistema HACCP, e a necessidade de implementar, avaliar e validar medidas de controle que minimizem os riscos de contaminação cruzada durante o processo de abate.

ABSTRACT

GOMES, Andressa Pinheiro, M. Sc., Uiversidade Federal de Viçosa, October 2008. ***Escherichia coli* Shiga-Toxigênica (STEC) in slaughterhouse of bovines in the State of Minas Gerais, Brazil.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Magdala Alencar Teixeira, Arnaldo Chaer Borges and Maria Aparecida Scatanburlo Moreira.

Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, STEC, has emerged as a pathogen that can cause food-borne infections and severe and potentially fatal diseases such as hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS). Most HC and HUS outbreaks have been attributed to strains of entero-hemorrhagic serotype O157:H7, but there is growing interest on the risk to human health associated with the non-O157 STEC serotypes carried by beef products contaminated by ruminant feces. This study aimed to determine the occurrence of STEC in a cattle slaughterhouse located in the State of Minas Gerais. Sampling was carried out in two lots; Lot A with 75 bovines and Lot B with 51 animals in three stages of the slaughtering line: removal of skin after bleeding, carcass after sawing, and feces during evisceration. Samples were collected from ten animals of each lot. The samples were enriched in modified EC broth (mEC) and modified EC added with novobiocin (mECn) followed by isolation of typical colonies on Sorbitol MacConkey Medium. Two hundred and forty-one bacterial isolates obtained

from the two lots, were identified as *E. coli*. Of these, 104 were derived from the skin, 93 from fecal material and 44 from carcasses. Polymerase chain reaction detected the *stx* gene in 18 isolates of *E. coli*. These isolates were obtained from six animals: four were of fecal origin and come from lot A; two were from carcasses from lot B. Enrichment in mECn resulted in isolates originated from one animal, whereas in mEC, the isolates were originated from five bovines. Isolates *stx* positive were analyzed for the *hlyA* gene encoding enterohemolysin. Four *hlyA* positive isolates originated from two bovines, one from lot A and another from lot B. Two displayed the enterohemolytic phenotype and were isolated from the carcass. Ten of the 18 potentially STEC isolates showed cytotoxic effect on Vero cells. Eight isolates from three different animals had the *stx* PCR amplicons sequenced. The translated sequences obtained from *stx* of three isolates from the carcass and of one isolate from feces corresponded to Stx2, showing 98% to 99% identity, with references at the GeneBank (NCBI). The sequences inferred from four amplicons obtained from isolates of faecal origin corresponded to Stx1, with 94% to 96% identity. The presence of STEC in the feces and carcasses of cattle at a slaughterhouse in the state of Minas Gerais emphasizes the importance of establishing a HACCP system and the need for implementation, evaluation, and validation of control measures to minimize the risk of cross-contamination during and after slaughter.

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli Shiga-toxigênica, STEC, tem emergido como patógeno que pode causar infecções de origem alimentar e doenças severas e potencialmente fatais, como Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH). A maioria dos surtos de CH e SUH tem sido atribuída a estirpes do sorotipo entero-hemorrágico O157:H7, entretanto existe interesse crescente sobre o risco à saúde humana associado com os sorotipos STEC não-O157. A patogênese das doenças causadas pela STEC é multifatorial e envolve níveis de interação entre a bactéria e o hospedeiro. Portanto, a produção das toxinas tipo Shiga (Stx) é essencial, mas não unicamente responsável pelos efeitos patogênicos.

Ruminantes, especialmente os bovinos, parecem ser o principal reservatório das STEC e, portanto, a principal fonte de infecção de humanos. A contaminação fecal e a contaminação cruzada durante os processos de remoção do trato gastrointestinal e da pele na linha de abate são importantes vias de transmissão de STEC para carcaças e seus produtos.

A presença desse patógeno em carnes cruas é uma evidente preocupação em Saúde Pública não somente pela severidade das doenças que pode causar, mas também pela baixa dose infectiva, pelo aumento na incidência mundial e pela tolerância desse organismo a condições de acidez, refrigeração e atividade de água reduzida sob refrigeração e congelamento.

Considerando a importância das EHEC como patógenos de origem alimentar, sua heterogeneidade, a alta prevalência em bovinos de corte e em seus produtos e a falta de dados sobre esse patógeno no Brasil, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência das STEC em uma linha de abate de bovinos por meio da identificação e caracterização dos isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Escherichia coli habita o trato gastrintestinal de humanos e animais endotérmicos como simbioses inofensivos, porém existem estirpes de *E. coli* patogênicas que podem causar uma variedade de doenças em animais e humanos. Atualmente, são reconhecidos seis patótipos de *E. coli* enteropatogênica: *E. coli* enteropatogênica-EPEC, enterotoxigênica-ETEC, enterohemorrágica-EHEC, enteroinvasiva-EIEC, enteroagregativa-EAEC e difusa-aderente-EDEC (NATARO; KAPER, 1998; DONNENBERG; WHITTAM, 2001; TORRES et al., 2005; DUFFY et al., 2007). Estirpes de *E. coli* que causam doenças diarreicas incluem patógenos de importância mundial em saúde pública. Essas estirpes são caracterizadas dentro de grupos específicos com base nas propriedades de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromes clínicas e distintos sorotipos, diferenciados por meio de três principais antígenos de superfície: os antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (K) (DOYLE, 1997).

Escherichia coli Shiga-toxigênica (STEC), também referida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), tem emergido como patógeno que pode causar infecções de origem alimentar, doenças severas e potencialmente fatais, cujo espectro clínico inclui diarreia branda, diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmico-hemolítica (SUH) (PATON; PATON, 1998; KARMALI, M.A., 2004; CHO et al., 2006; MORA et al., 2007), que se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e

insuficiência renal aguda (KARMALI, 2005) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), caracterizada por anomalias no sistema nervoso central (PATON; PATON, 2000).

E. coli Shiga-toxigênica – STEC constitui um grupo de *E. coli* capaz de produzir toxinas tipo Shiga (Stx), estruturalmente e biologicamente similares às toxinas produzidas pela *Shigella dysenteriae* tipo1, e causar efeitos patológicos em células Vero – VTEC. O termo *E. coli* entero-hemorrágica – EHEC designa um subgrupo de STEC, caracterizado pela combinação dos sintomas que elas produzem e pelos fatores de virulência que possuem. Também possuem o *locus* de destruição de enterócitos (LEE) que codifica o gene *eae* responsável pelas lesões do tipo A/E, ou seja, exibem atividade de aderência e destruição, expressam toxinas tipo Shiga, possuem o plasmídeo de 60-MDa (NATARO; KAPPER, 1998; DONNENBERG; WHITTAM, 2001; LAKE et al., 2002; KARMALI, 2004; CAPRIOLI et al., 2005; TARR et al., 2005; WATTERWORTH ET et al., 2005; CRISTANCHO et al., 2008) e podem causar colite hemorrágica (CH), síndrome urêmico-hemolítica (SUH) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) em humanos. EHEC é definida como *E. coli* Shiga-toxigênica – STEC pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998).

Análises moleculares sugerem que EHEC adquiriu a maioria dos seus fatores de virulência por transferência horizontal do material genético. A aquisição da LEE e dos genes *stx* foram dois passos cruciais na evolução dos ancestrais comensais para as EHEC (CAPROLI et al., 2005). Genes de pelo menos oito fatores de virulência são demonstrados: produção da toxina tipo Shiga (*stx*₁ e, ou, *stx*₂), formação da intimina (*eae*)- fator de adesão, presença de EHEC-hemolisina (*hlyA*), produção de uma proteína do tipo Serinoprotease (*espP*), de uma enterotoxina termoestável (EAST), presença de peroxidase catalase (*katP*), sistema de secreção tipoll (*etpD*) e adesina de autoaglutinação de STEC (*saa*) (CHO et al., 2006). Entre esses, a toxina tipo Shiga (Stxs), intimina (Adesina), e a produção de entero-hemolisina (Ehly), também reconhecida como hemolisina-EHEC (EHEC-*hly*), são os fatores de virulência considerados mais importantes.

As citotoxinas Stx, codificadas pelos fagos parecem ser essenciais, mas não unicamente responsável pelos efeitos patogênicos (CAPRIOLI et

al., 2005). Existem dois principais grupos de toxinas tipo Shiga - Stx : Stx1 e Stx2. Stx1 consiste de Stx1, Stx1c e Stx1d, o grupo Stx2 pode ser subdividido em pelo menos cinco subtipos: Stx2, Stx2c, Stx2c2, Stx2d, Stx2e e Stx2f (SCHEUTZ et al., 2001; SERNA; BOEDEKER, 2008). Todas essas toxinas têm sido encontradas em isolados humanos. *E. coli* que produz Stx1, ou Stx1 e Stx2, é menos virulenta, em comparação com as estirpes que produzem somente Stx2 (SERNA; BOEDEKER, 2008). A produção das toxinas Stx é um pré-requisito para as doenças mediadas pelas EHEC. Além dos danos intestinais associados com a infecção, as toxinas Stx são responsáveis também pelas complicações pós-diarréicas (CH, SUH, PTT) que ameaçam a vida (CHO et al., 2006). Estudos epidemiológicos, juntamente com experimentos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que Stx2 é o fator de virulência mais importante associado com doenças humanas severas (SABLET et al., 2008).

Membros da família Stx são toxinas – AB₅, compostas por uma única subunidade – A catalítica ligada não-co-valentemente a cinco subunidades – B. O pentâmero – B das Stxs liga-se a um receptor glicolipídico específico (Gb3-Globotriacilceramida; Gb4) na membrana da célula-alvo. A toxina é internalizada por endocitose mediada pelo receptor di-galactose, que por um “transporte retrógrado” alcança o reticuloendoplasmático via complexo de golgi. Dentro da célula do hospedeiro, a subunidade A é proteoliticamente clivada, tornando-se o fragmento A₁ enzimaticamente ativo, o qual cliva a ligação N-glicosídica do RNAr 28s em um resíduo de adenina, bloqueia o alongamento da cadeia peptídica e, conseqüentemente, inibe a síntese protéica (FRASER et al., 2004; SABLET et al., 2008).

Além da produção das Stx, a colonização da mucosa intestinal do hospedeiro é outro determinante fundamental de virulência. A maioria das STEC incluindo o grupo EHEC coloniza a mucosa intestinal por meio de um mecanismo de adesão e destruição – “attaching and effacing” (A/E), o qual é geneticamente governado por uma Ilha de patogenicidade (PAI) grande definida como locus de destruição dos enterócitos (LEE) (KUHNERT et al., 2000). A LEE é constituída por três domínios funcionais: o sistema de secreção tipo III (TTSS, que exporta moléculas efetoras; os genes *eae* e *tir*, na região central, que codifica, respectivamente, a “intimina” e o “receptor da

intimina translocado” (Tir), que é translocado para dentro da membrana plasmática do hospedeiro (protoplasma) pelo sistema TTSS, e genes que codificam proteínas secretadas EspA, B e D, as quais funcionam como parte do sistema de secreção tipo III (NATARO; KAPER, 1998). Proteínas secretadas pela LEE têm sido implicadas na apoptose (SERNA; BOEDEKER, 2008). Embora o produto do gene *eae* seja considerado fator de virulência importante na colonização, outro fator de aderência codificado pelo gene *saa* pode contribuir para a virulência das STEC (CHO et al., 2006).

As hemolisinas (citolisinas) são importantes fatores de virulência de bactérias causadoras de doenças extra-intestinais (CAVALIERI et al., 1984). A entero-hemolisina (Ehly) está fortemente associada com isolados de STEC de doenças severas humanas (BOERLIN et al., 1999), portanto aos sorotipos O157, O26 e O111 de *E. coli* (BEUTIN et al., 1989).

Estimativas apontam que até 5% de pacientes com diarreia sanguinolenta evoluem para SUH, e cerca de 90% dos casos de SUH estão relacionados à infecção por STEC. A SUH é observada mais freqüentemente em crianças menores de 5 anos e idosos, sendo causa principal de insuficiência renal aguda em crianças (KARMALI, 1989). Até 40% dos pacientes com SUH desenvolvem disfunção renal, e acima de 3% a 5% dos pacientes morrem durante a fase aguda da doença (TROMPETER et al., 1983; LOIRAT et al., 1984; SIEGLER et al., 1991). Não existe tratamento específico para SUH, e vacinas não estão ainda disponíveis (KARMALI, 2005). Embora a incidência das infecções associadas à EHEC seja relativamente baixa, suas conseqüências severas e algumas vezes fatais à saúde, particularmente entre crianças e idosos, fazem dela uma das infecções de origem alimentar mais séria (WHO, 2007).

A maioria dos surtos de CH e SUH foi atribuída a estirpes do sorotipo entero-hemorrágico O157:H7. Entretanto, existem outros sorotipos que compartilham potencial patogênico similar em humanos, especialmente O26:H11, O26:NM, O103:H2, O111:NM, O113:H21, O145:NM e O128:NM (WHO, 1998). De acordo com o Center for Disease Control and Prevention – CDC, estima-se que *E. coli* O157 causa 73.000 casos e cerca de 60 mortes, enquanto STEC não-O157 provoca 36.000 infecções e 30 mortes

anualmente nos Estados Unidos (MEAD et al., 1999 citados por CHO, S., 2006).

Escherichia coli Shiga-toxigênica – STEC é classificada em sorotipos (A-E) com base na incidência relativa desses sorotipos em doenças humanas e sua associação com surtos e doenças severas, diferenciando-as em estirpes de acordo com o potencial patogênico (KARMALI et al., 2003):

Sorototipo A: Inclui os sorotipos O157:H7 e O157:NM, os quais são as causas mais comum de surtos e SUH.

Sorototipo B: Inclui os sorotipos não-O157, que são associados com surtos e SUH, mas menos comumente que sorotipos O157:H7 e O157:NM.

Sorototipo C: Inclui os sorotipos não-O157, que são associados com SUH esporádicas, mas não epidêmicas.

Sorototipo D: Contém muitos sorotipos que são associados com diarreia, mas não com surtos ou SUH.

Sorototipo E: Abrange os sorotipos STEC não-humanos ou encontrados em animais, mas não são associados com doenças humanas.

Existe interesse crescente sobre o risco à saúde humana associado com os sorotipos STEC não-O157. Mais de 200 sorotipos foram associados com doenças humanas (WHO, 1999). Estas são mais predominantes em animais e como contaminantes em alimentos, e por isso os humanos são provavelmente mais expostos às STEC não-O157 (MORA et al., 2007). Sorotipos não-O157 são mais comumente implicados em SUH que o sorotipo O157:H7 na América Latina (LOPEZ et al., 1998 citados por KARMALI, 2004), Austrália (ELLIOTT et al., 2001 citados por KARMALI, 2004), e sua frequência pode aumentar na Europa (TOZZI et al., 2003). Mundialmente, STEC não-O157 foi associada a aproximadamente 30% dos casos de SUH nas últimas décadas (HUSSEIN; OMAYE, 2003). Até 20% dos casos de SUH na América do Norte foram associados com STEC não-O157 (BANATVALA et al., 1996). Nos Estados Unidos, *E. coli* O111 e O26 são os agentes etiológicos mais predominantemente associados com infecções STEC não-O157 (FSIS, 2007).

Entre 76 sorotipos STEC não-O157, 17 foram reconhecidos como causa de SUH, e 15 sorotipos eram causadores de cólicas abdominais, diarreia moderada, diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica (WHO, 1998; BLANCO et al., 2003).

Na Argentina, a SUH é endêmica, com aproximadamente 300 novos casos informados por ano pelas Unidades Hospitalares Nefrológicas. STEC O157:H7 é o sorotipo mais prevalente associado com a HUS, mas vários outros sorotipos foram isolados de pacientes (MEICHTRI et al., 2004).

No Brasil, as infecções humanas por STEC são restritas a casos esporádicos de diarreia não-hemorrágica, particularmente em crianças jovens, e, embora a estirpe O157:H7 tenha sido recentemente identificada (IRINO et al., 2002), os principais sorotipos associados com essas infecções foram O26:H11, O111: NM, O111: H8, O103:H2 e O91:H21 (CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al., 2002; VAZ et al., 2004; GUTH et al., 2005). Casos de SUH associados com STEC O26:H11 foram também identificados (GUTH et al., 2003).

A maioria das infecções foi atribuída ao consumo de carne bovina crua ou mal cozida (KOOHMARAIE, 2005), contaminada com STEC. Surtos atribuídos a STEC não- O157 incluem o consumo de leite cru (CDC, 1995) e carne de boi contaminada (WERBER et al., 2002), acampamentos (CDC, 2000) e contato direto com animais (SMITH et al., 2004). Recentes surtos associados com exposição aos animais têm documentado o risco potencial para pessoas que em contato com ruminantes ou seus ambientes.

Ruminantes, especialmente os bovinos, são o principal reservatório de STEC, e suas fezes são fonte de contaminação para outros produtos alimentícios (SERNA; BOEDEKER, 2008). Uma variedade de alimentos foram implicados como veículos na transmissão de STEC, carne moída, lingüiça, vegetais (espinafre, brotos), frutas (suco de maçã) e produtos lácteos (WHO, 2005).

STEC são veiculadas para os humanos, principalmente via água, via alimentos contaminados (KARMALI, 2005) e pelo contato entre pessoas. No entanto, podem também ser transmitidas pelo contato direto com animais infectados e via oral-fecal (WHO, 2005). Apesar de existirem outras rotas de transmissão para STEC, a carne bovina, especialmente a moída, é o

principal veículo de STEC. Em vários países, as STEC não-O157, por exemplo sorogrupos O26, O91, O111, O103, O113 e O145, são predominantes no bovino de corte e seus produtos (HUSSEIN; BOLLINGER, 2005).

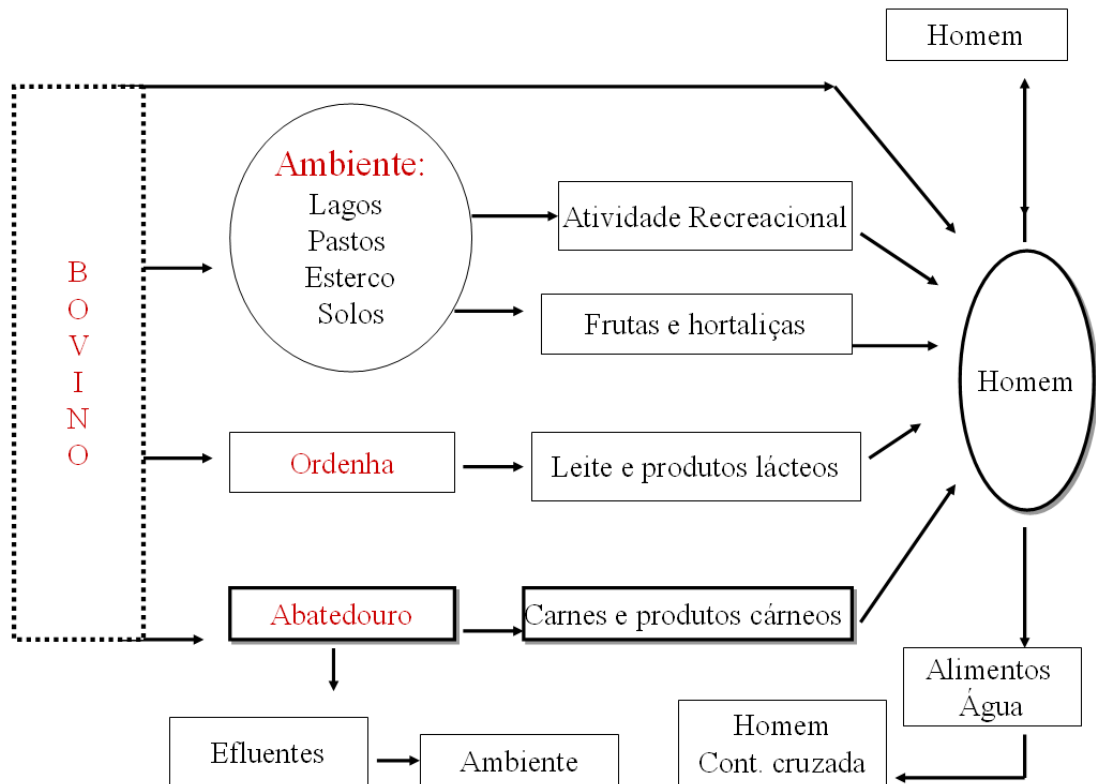


Figura 1 – Rotas de transmissão.

A presença desse patógeno (STEC não-O157) em carnes cruas é uma preocupação evidente em saúde pública, pois é necessário baixo número de células viáveis para causar a doença (ACMSF, 1995; BOLTON et al., 1996; KOOHMARAIE et al., 2005). No Brasil, foi observada alta prevalência das estirpes de STEC não-O157 em animais e alimentos, apesar da baixa incidência de infecções humanas (CERQUEIRA et al., 1997, 1999).

A tolerância das EHEC a uma ampla extensão de condições de pH, atividade de água (a_w) e baixas temperaturas, incluindo congelamento (BUCHANAN; DOYLE, 1997), faz com que exista considerável potencial

para esses organismos sobreviverem em muitos ambientes que processam os alimentos e em muitos tipos de alimentos. A presença de estirpes virulentas de *E. coli* no ambiente não somente representa fonte potencial de contaminação, mas também reservatório em potencial de genes de virulência que poderão ser fonte de novas formas de estirpes patogênicas (MALDONADO et al., 2005).

Os fatores de risco contribuem com a ocorrência de um perigo de origem alimentar. Podem contribuir para a introdução, aumento ou redução dos agentes perigosos. Os fatores de risco são influenciados pela qualidade da matéria-prima e pelas etapas dentro do ambiente de processamento, como também pela composição e condições de acondicionamento e armazenamento do produto final.

E. coli patogênica pode estar presente em tecidos de carne vermelha fresca pelo fato de o processo de abate não garantir ausência completa de bactérias enteropatogênicas, incluindo as VTEC (ICMSF, 1998). A frequência e o nível dessas bactérias nas carcaças variam, dependendo da fazenda, da criação, das condições climáticas, do transporte, do curral e das condições no processo de abate (APHA, 2001).

A contaminação fecal e a contaminação cruzada durante o processamento de alimentos são apontadas como importantes vias de transmissão. As plantas de processamento de carne bovina são as principais fontes de contaminação, principalmente durante os processos de remoção do trato gastrointestinal e da pele, fontes potenciais de STEC (KOOHMARAIE et al., 2007).

A maioria das medidas de controle que objetivam minimizar a transferência de patógenos para as carcaças e produtos foi fundamentada em estudos que utilizaram *E. coli* O157:H7 como modelo das STEC. Entretanto, a eficácia dessas medidas deve ser testada em todas as estirpes STEC patogênicas. A melhor maneira para controlar e eliminar patógenos é o conhecimento de suas fontes e a prevalência no ambiente (KOOHMARAIE et al., 2005).

Agências federais e outros órgãos envolvidos na segurança alimentar constataram a utilidade do uso da estruturação da análise de risco como meio de organizar informações disponíveis e identificar lacunas a partir de

uma abordagem holística para administrar os riscos, a qualidade e segurança alimentar na produção de carne e, posteriormente, obter controles efetivos em todas as etapas da cadeia alimentar.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) desenvolveram uma metodologia de gerenciamento dos riscos em alimentos na saúde pública. A abordagem usada é chamada de “Análise de Riscos”, um processo que consiste de três componentes interconectados: Avaliação dos Riscos, Gerenciamento dos Riscos e Comunicação dos Riscos (BUCHANAN, 2004).

O diagrama abaixo ilustra o relacionamento entre os três componentes da análise de risco.

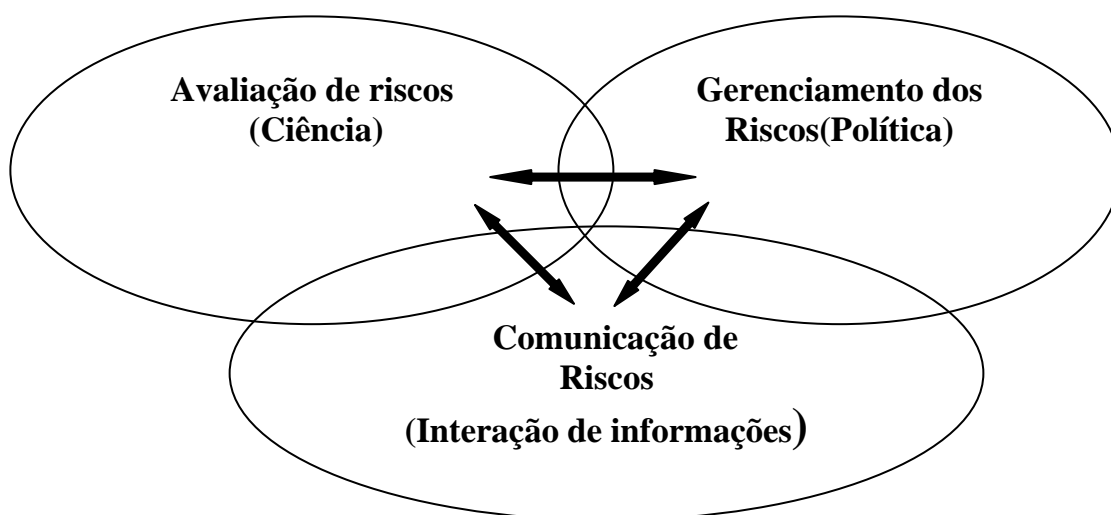


Figura 2 – Estrutura de análise de riscos.

Fonte: <<http://www.who.int/foodsafety/micro/riskanalysis/en/index.html>>. Acesso em: 11 maio 2006.

Avaliação de riscos é um processo estruturado para determinar o risco associado a qualquer tipo de perigo – biológico, químico ou físico – em alimentos. Esse processo é avaliado quantitativa e qualitativamente e consiste das seguintes etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (CODEX, 1998).

A identificação do perigo é um processo predominantemente qualitativo. O propósito da identificação do perigo para agentes microbianos é identificar os microrganismos ou toxinas microbianas de importância no alimento, bem como determinar se um microrganismo ou toxina microbiana é um perigo em potencial no alimento. Os perigos podem ser identificados a partir de fontes de dados, como literatura científica; de banco de dados, como indústria alimentícia, agências governamentais, organizações internacionais relevantes e opiniões de especialistas. As informações sobre os perigos podem ser obtidas de informações relevantes que incluem dados de áreas como: vigilância e estudos epidemiológicos, estudos clínicos, laboratórios de estudos de animais, características dos microrganismos e interação entre microrganismos e seu ambiente ao longo da cadeia alimentícia desde a produção primária até o consumo (CODEX, 1998).

A avaliação da exposição consiste na avaliação quantitativa e, ou, qualitativa da provável ingestão do patógeno e, ou, toxina via alimento, como também a exposição a partir de outras fontes se for relevante (CODEX, 1998). Estima-se o nível, dentro de vários níveis de incertezas, do patógeno ou toxina microbiana, assim como a probabilidade de sua ocorrência nos alimentos no momento de consumo.

Fatores a serem considerados na avaliação da exposição incluem frequência de contaminação dos alimentos por agentes patogênicos e sua concentração nesses alimentos com o passar do tempo (CODEX, 1998). Esses fatores são influenciados por características do agente patogênico; ecologia microbiana dos alimentos; contaminação inicial da matéria-prima, incluindo considerações das diferenças regionais e sazonalidade da produção; nível de sanitização e do controle do processo; métodos de processamento, empacotamento, distribuição e armazenamento do alimento; e qualquer passo de preparação como cozimento e manipulação.

A avaliação da exposição deve descrever a via desde a produção até o consumo.

A caracterização do perigo refere-se à avaliação quantitativa e, ou, qualitativa da natureza do efeito adverso à saúde associado ao perigo (microbiológico). A avaliação dose-resposta deve ser realizada se dados estiverem disponíveis (CODEX, 1998). O propósito da caracterização do

perigo é estabelecer uma estimativa da natureza, severidade e duração do efeito adverso associado ao patógeno no alimento. Fatores importantes que devem ser considerados na caracterização do perigo são relacionados aos microrganismos, à dinâmica de infecção e ao indivíduo afetado.

Em relação aos microrganismos, são de importância as considerações sobre a capacidade de replicação; a virulência e infectividade podem ser modificadas dependendo da sua interação com o hospedeiro e ambiente; o material genético pode ser transferido entre microrganismos, com a ocorrência de transferência de características, como fatores de virulência e resistência a antibióticos; se as características de virulência e resistência podem ser disseminadas por meio de transmissão secundária e terciária; o período de incubação; se o microrganismo pode permanecer no indivíduo e ocasionar excreção contínua do microrganismo e risco de sucessivas contaminações e infecções; se doses baixas de alguns microrganismos podem causar em alguns casos efeito severo e, finalmente, se os atributos do alimento podem alterar a patogenicidade microbiana, a exemplo do conteúdo de gordura (CODEX, 1998).

A caracterização do risco é o processo em que se realiza a estimativa quantitativa e, ou, qualitativa, incluindo as incertezas da probabilidade de ocorrência e severidade dos efeitos adversos à saúde em potencial ou conhecidos em dada população fundamentada na Identificação do perigo, caracterização do perigo e avaliação da exposição. É a última etapa da avaliação dos riscos, do qual estratégias do gerenciamento dos riscos podem ser formuladas (CODEX, 1998).

O gerenciamento ou gestão dos riscos é processo de avaliar as alternativas políticas à luz dos resultados de uma avaliação do risco e, se requerido, selecionar e programar opções de controle apropriadas, incluindo medidas reguladoras (CODEX, 1998).

A comunicação dos riscos consiste na troca de informações e opiniões concernentes ao risco e gerenciamento do risco entre avaliadores e gestores do risco, consumidores e outras partes interessadas (CODEX, 1998).

Considerando a importância das EHEC como patógenos emergentes de origem alimentar, sua heterogeneidade, a alta prevalência no gado de

corde, a probabilidade de os produtos cárneos serem contaminados, via exposição ao material fecal durante o processamento, e a falta de dados deste patógeno, no Brasil, justificam a realização deste trabalho para determinar a possível ocorrência das STEC potencialmente virulentas e citotóxicas na linha de abate de carne bovina.

Os dados obtidos poderão contribuir para a identificação de possíveis fontes de contaminação na planta de processamento de carne bovina, para o desenvolvimento de estratégias de controle que efetivamente reduzirão os riscos de contaminação e a disseminação de patógenos durante o abate e de infecções humanas e, também, fundamentar a necessidade de se aplicar a metodologia para matadouros frigoríficos em outras partes do país.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial – Departamento de Microbiologia, localizado no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

3.1. Coleta de amostras no abatedouro

As amostras foram coletadas em Matadouro Frigorífico localizado na Zona da Mata, Estado de Minas Gerais. O frigorífico, de médio porte, tinha capacidade para abater 70 bovinos e 120 suínos diariamente.

As amostras foram obtidas da pele, de material fecal e de carcaças de um mesmo animal em três etapas na linha de abate: pele, após a sangria; carcaça, após a serragem das carcaças e fezes, durante a evisceração. Dois lotes de 51 e 75 bovinos, respectivamente, foram amostrados. Um lote foi definido como bovinos de uma única fonte e mantidos como um grupo durante o abate (ARTHUR et al., 2002). Dez dos animais em cada lote foram amostrados.

As amostras de pele e carcaça foram obtidas usando-se *swabs* (Inlab, Indústria brasileira) umedecidos em 5 mL de água peptona tamponada (Difco Laboratories, USA) e moldes de 100 cm² (Laborclin- LB), para delinear as respectivas áreas. Cada amostra consistiu de aproximadamente

cinco esfregaços do *swab* na horizontal e cinco esfregaços na vertical (ARTHUR et al., 2004). A pele foi amostrada em uma área de 100 cm², no pescoço, após a sangria. As carcaças foram amostradas utilizando-se *swabs* (Inlab, Indústria brasileira) umedecidos com água peptona tamponada e 1% Tween 80, em três diferentes áreas de 100 cm², no mesmo lado da carcaça, próximo ao anus, em uma área total de 300 cm² (FSIS, 1996). Os *swabs* (Inlab, Indústria brasileira) da pele e da carcaça foram colocados diretamente dentro de 20 tubos, com 10 ml de caldo EC modificado (mEC). As amostras fecais foram coletadas assepticamente do cólon e acondicionadas em recipientes estéreis. Todas as amostras foram transportadas sob refrigeração para o laboratório, onde o material fecal foi adicionado em 10 ml de caldo mEC. A Novobiocina, 20 mg L⁻¹, foi adicionada em 10 tubos de cada amostra. Todos foram incubados a 37 °C, por 18 horas.

3.2. Detecção e isolamento de *Escherichia coli* Shiga-toxigênica (STEC)

Os meios de enriquecimento seletivo empregados foram caldo mECn, caldo EC modificado contendo Novobiocina (20 mg L⁻¹) e caldo mEC sem Novobiocina. Ambos foram incubados a 37 °C, por 18 horas. As amostras enriquecidas foram posteriormente diluídas em água peptonada tamponada, e alíquotas de 100 µl das três últimas diluições (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷) foram inoculadas em ágar MacConkey Sorbitol (Difco, USA) pela técnica *spread plate*. As placas foram incubadas a 37 °C, por 18 a 24 horas. Três (3) colônias fermentadoras (rosa-vermelho) e não-fermentadoras de sorbitol (incolores, irregulares) foram selecionadas e repicadas em ágar Eosina Azul de Metileno (Difco, USA). A presença de colônias típicas de *E. coli*, púrpuras com brilho verde-metálico e não-típicas, foi avaliada após 18 a 24 horas de incubação a 37 °C. Duas ou mais colônias típicas e atípicas de cada isolado foram transferidas para tubos contendo ágar-padrão para contagem (PCA), para posterior identificação bioquímica.

3.3. Identificação Bioquímica

Após a incubação por 24 horas, a 37 °C, as culturas puras foram submetidas ao teste bioquímico IMVIC (Indol, Vermelho-de-Metila, Voges-Proskauer e Citrato), para a identificação de *E. coli*: Biotipo I (++--) e Biotipo II (-+--)(APHA, 2001). Os controles utilizados foram: *E. coli* – controle positivo; *Enterobacter aerogenes* – controle negativo, *E. coli* O157:H7 – controle positivo e *E. coli* Shiga-toxigênica – controle positivo.

3.4. Identificação genotípica de STEC pela presença de *stx*₁/*stx*₂ e *hly*

A presença dos genes codificadores das toxinas tipo Shiga, *stx*₁/*stx*₂ foi detectada por reação em cadeia da polimerase – PCR. Oligonucleotídeos específicos, SRM 128 e SRM 129 foram utilizados para a amplificação dos genes *stx*₁/*stx*₂, descritos por Monday et al. (2007), nas condições recomendadas. Os oligonucleotídeos lêem as seguintes seqüências de nucleotídeos:

- SRM128 CTGATTGTTGAGCGAAATAATTTATATGTG
- SRM 129 TGATGATGACAATTCAGTATAACTGCCA

O amplicon esperado nos resultados positivos é de aproximadamente 528 pb.

A presença dos genes que codificam a entero-hemolisina, *hlyA*, foi detectada por reação em cadeia da polimerase – PCR. Oligonucleotídeos específicos, HlyA-F e HlyA-R, foram utilizados para a amplificação dos genes *hly*, descritos por Osek (2003), nas condições recomendadas. Os *primers* lêem as seguintes seqüências de nucleotídeos:

- HlyA-F GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC
- HlyA-R AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T

O amplicon esperado nos resultados positivos é de aproximadamente 534 pb.

Os controles positivos de *E. coli* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Tomomasa Yano, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do

Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. *E. coli* K12 foi utilizada como controle negativo.

3.4.1. Amplificação por PCR e análise do DNA por eletroforese

As reações de amplificação foram feitas em microtubos de 200 µl contendo tampão 1x (Promega, Madison, Wis.), 1,25 unidade de Taq polimerase (Promega, Madison, Wis.), dNTPs 2,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 10 µM de cada primer e água milliQ para um volume final de 25 µl. As amplificações ocorreram em um termociclador Techine TC 512 (Barloworld Scientific, Staffordshire – Inglaterra), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C, por 10 minutos, seguido s de 40 ciclos, a 94 °C, durante 30 segundos, 53 °C durante 1,5 minuto e 72 °C durante 1 minuto, seguido de uma etapa de extensão final a 72 °C, durante 7 minutos. As amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídio na concentração de 0,2 µg/ml. O tempo de corrida foi de aproximadamente 1 hora, a 100 volts. As imagens foram capturadas em Eagle Eye (Stratagene, LaJolla, CA, EUA) sob luz ultravioleta.

3.5. Seqüenciamento

O Seqüenciamento dos amplicons foi feito no Laboratório de Genômica – BIOAGRO, em Seqüenciador Mega Bace^(R) 1000 (Amersham Biosciences), utilizando-se Dyenamic ET Dye Terminator Kit.

3.6. Análise da citotoxicidade em células Vero

3.6.1. Preparo das toxinas

Os isolados de *E. coli* potencialmente shiga-toxigênicos – STEC foram cultivados em 5 ml de caldo BHI (Difco, USA) durante 24 horas, a 37 °C. Após 5 horas de incubação, foi adicionada mitomicina C (1 µg/ml). As culturas foram centrifugadas a 10.000 g, por 10 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram filtrados em membranas com poros de 0,22 µm, sendo os filtrados foram estocados a -20 °C.

3.6.2. Análise do potencial citotóxico das estirpes potencialmente Shiga-toxigênicas – STEC

Células de linhagens de rim de Macaco Verde Africano, células Vero, foram propagadas em garrafas de 25 cm² contendo Meio Essencial Mínimo (MEM), penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino. No teste de citotoxicidade, as monocamadas de células confluentes foram tripisinizadas utilizando-se métodos padronizados, para posteriormente serem adicionadas em microplacas com 24 compartimentos, as quais foram incubadas a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, 50 µl de cada filtrado, preparado em três diluições 1/20, 1/40 e 1/80, foram adicionados em triplicata em cada compartimento, que continha 0,4 ml de meio. As alterações morfológicas da célula, com perda de monocamada, granulação, alongamento e estreitamento dos prolongamentos e escurecimento das bordas celulares, indicativas do efeito citotóxico de ST/VT, foram observadas ao microscópio de contraste de fase após 24 e 48 horas de incubação (BLANCO et al., 1988).

3.7. Detecção de entero-hemolisina (Ehly)

As estirpes de STEC foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C, com agitação de 150 rpm (Thermo Electron, Orbital). Após duas horas, foram inoculadas em ágar sangue triptose suplementado com 10 mmol l⁻¹ CaCl₂ e 5% de sangue de carneiro desfibrinado, lavado em salina fosfatotamponada (PBS), pH 7,2. As placas foram incubadas a 37 °C e avaliadas após 24 horas. O fenótipo entero-hemolítico foi detectado pela ocorrência de zonas de hemólise pequenas e com turbidez (BEUTIN et al., 1989; SCHMIDT et al., 1995).

Estirpe de *E. coli* C3888 cedida pelo Dr. Tomomasa Yano, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual e Campinas – UNICAMP, foi utilizada como controle positivo, enquanto *E. coli* K12 o foi como controle negativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duzentos e quarenta e um isolados bacterianos obtidos de bovinos de dois lotes de abate foram identificados como *Escherichia coli*. Desses, 104 foram provenientes da pele, 93 do material fecal e 44 das carcaças.

A detecção de *E. coli* em meio de enriquecimento seletivo (mEC) foi influenciada pela presença de Novobiocina (Quadro 1), o que pode ser observado pelo número de bovinos, em cada lote de 10 animais, com resultados positivos para *E. coli*, nos três tipos de materiais examinados: pele, fezes e carcaça. Na presença de Novobiocina, 40% dos bovinos do lote A foram positivos para STEC e 80% do lote B, na pele, enquanto na ausência do antibiótico 60% foram positivos nos lote A e 50% no lote B. Em carcaças do lote B, *E. coli* foi detectada apenas em ausência de Novobiocina (Quadro 1). Portanto, o uso de Novobiocina resultou em isolamento de estirpes de *E. coli* que não foram necessariamente detectadas durante a ausência desse antibiótico, e vice-versa (resultados não-mostrados).

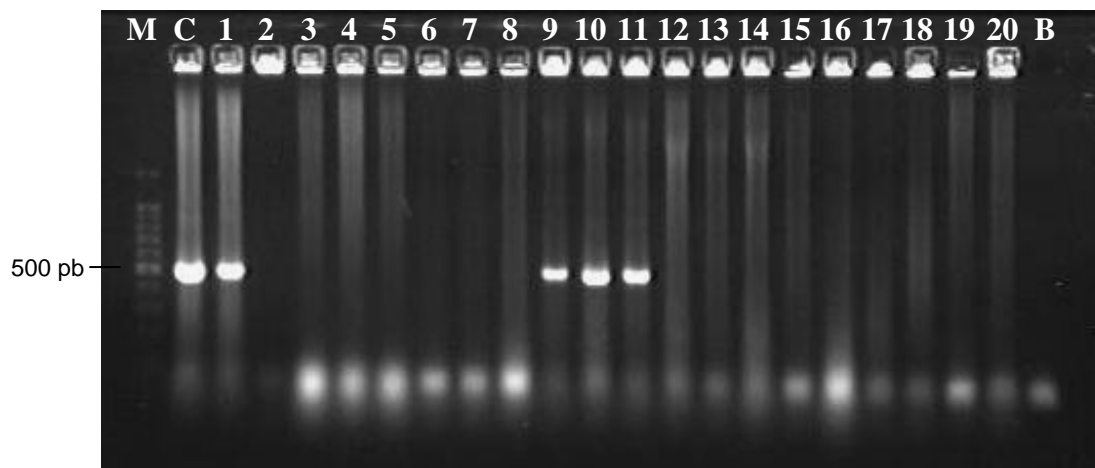
Quadro 1 – Número de bovinos positivos para *Escherichia coli* isoladas em meio de enriquecimento seletivo, EC modificado - mEC com e sem Novobiocina

Novobiocina	Lote A			Lote B		
	Pele	Fezes	Carcaça	Pele	Fezes	Carcaça
Presente	4	5	2	8	10	-
Ausente	6	7	4	5	6	2

Total de bovinos por lote: 10.

Estirpes de *E. coli* potencialmente shiga-toxigênicas – STEC foram identificadas pela presença dos genes *stx*₁/*stx*₂, codificadores das toxinas tipo Shiga, detectados por reação em cadeia da polimerase – PCR. Foram obtidos 18 isolados de *E. coli* potencialmente STEC pela detecção dos amplicons com aproximadamente 528 pb (Figura 3). A partir dos 93 isolados de *E. coli* obtidos do material fecal, 12 foram identificados como STEC e, entre os 44 isolados de *E. coli* provenientes das carcaças, seis foram identificados como potencialmente STEC. No lote A, apenas em *E. coli* de um bovino foi detectado o gene *stx*, isolado em meio com Novobiocina, enquanto no meio sem esse antibiótico foram detectados em estirpes provenientes de três bovinos. No lote B identificou-se a presença dessa bactéria apenas em carcaças de dois bovinos, utilizando meio sem Novobiocina (Quadro 2).

A porcentagem de bovinos positivos para STEC foi maior na ausência de Novobiocina (83%), no entanto a adição desse antibiótico no meio possibilitou a detecção de isolados – STEC que não teriam sido detectados na sua ausência. Da mesma forma, a utilização de caldo de enriquecimento seletivo sem Novobiocina – mEC possibilitou o isolamento de estirpes de STEC, as quais não teriam sido identificadas na presença desse antibiótico.



M: Marcador de tamanho – 100pb DNA Ladder; C: controle positivo (*stx*); Linhas 1 a 20: isolados
B: Branco

Figura 3 – Análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% de *stx* amplificado dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de matadouro frigorífico.

Quadro 2 – Número de bovinos positivos para *Escherichia coli* Shiga-toxigênica – STEC obtidas de enriquecimento seletivo, EC modificado – mEC com e sem Novobiocina

Novobiocina	Lote A			Lote B		
	Pele	Fezes	Carcaça	Pele	Fezes	Carcaça
Presente	-	1	-	-	-	-
Ausente	-	3	-	-	-	2

Total de bovinos por lote: 10.

Caldos de enriquecimento são atualmente empregados no isolamento de STEC antes de meios para sua detecção e identificação. Protocolo de enriquecimento contendo esse antibiótico tem sido recomendado como forma de garantir e, ao mesmo tempo, limitar o crescimento da microbiota competidora (VIMONT et al., 2007). A Novobiocina é o antibiótico mais comumente utilizado em caldos de enriquecimento para STEC. Esse antimicrobiano é ativo principalmente para bactérias Gram-positivas e para

algumas bactérias Gram-negativas freqüentemente presentes em amostras, as quais poderiam competir com STEC durante o enriquecimento. Além disso, STEC são tidas em geral como resistentes à Novobiocina, o que justificaria o seu maior uso em caldos de enriquecimento, comparado com outros antibióticos (VIMONT et al., 2006). No entanto, os protocolos de enriquecimento atualmente utilizados, algumas vezes, são inadequados não somente pelo uso de Novobiocina que pode inibir o crescimento de algumas estirpes de STEC, mas também pela ineficiência de outros protocolos em detectar baixas concentrações de células, em razão da microbiota competidora (VIMONT et al., 2007). A superioridade de um protocolo de enriquecimento sem antibióticos para o isolamento de *E. coli* O157:H7 de fezes de bovinos já foi demonstrada (FOSTER et al., 2003). A adição de Novobiocina em caldos de enriquecimento parece ser inadequada para o isolamento de STEC, pelo fato de algumas estirpes serem suscetíveis à Novobiocina (VIMONT et al., 2007). Novamente, os dados demonstraram que o meio sem Novobiocina foi o mais eficiente em detectar STEC, porém evidenciam também que algumas estirpes de STEC não teriam sido detectadas caso a Novobiocina não houvesse sido adicionada ao meio de enriquecimento (mEC) e o bovino seria considerado negativo para STEC.

A presença de estirpes patogênicas de *E. coli* num ambiente representa fonte potencial de contaminação de alimentos e de água. Além disso, essas estirpes se constituem em reservatório potencial de genes de patogenicidade e virulência que podem dar origem a novas estirpes patogênicas, por transferência gênica horizontal (KUHNERT et al., 2000; DONNENBERG; WHITTAM, 2001). A presença ou ausência de um gene em particular é insuficiente para predizer o potencial de virulência de uma estirpe STEC (MALDONADO et al., 2005), pois a expressão dos genes *stx*, ou seja, a produção da toxina nem sempre ocorre. Dessa forma, pode haver variabilidade nas respostas citotóxicas das estirpes positivas para o gene *stx* (O'LOUGHLIN, E.V.; ROBIN-BROWNEB, R.M., 2001).

Oito dos 18 amplicons *stx* obtidos foram seqüenciados. Destes, quatro corresponderam ao gene *stx2* com 98% a 99% de identidade com seqüências já conhecidas, e quatro apresentaram 94% e 96% de identidade com seqüências de *Stx1* já depositadas nos bancos de dados. Os genes

stx2 foram provenientes de *E. coli* isoladas de caldo mEC sem a adição de Novobiocina, a partir das carcaças e das fezes. Os genes *stx1* foram provenientes de espécimes, de origem fecal, que foram enriquecidas em caldo EC acrescido de Novobiocina (mECn). O alinhamento das seqüências de aminoácidos inferidas do seqüenciamento dos genes é apresentado nas Figuras 4 e 5.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                               110      120      130      140      150
*****  ** * ***** ***** * **  *****  *****
Ec 120 Stx1  FYRFADFSHV  TFPGXNSGYI  VWQLYHVTAC  XQGSVVRGXC  INRHSLTTSY
F6AN1      FYRFADFSHX  TFPGXNSGYI  VWQLYHVXAC  CQGSVVRGC-  INRHSLTTSY
F6AN2      XNRFADFSHX  TFXGTNSGYI  VWQLYXVXAC  XQGSVVRGXC  INRHSLTTSY
F6AN3      FXRFADFSHV  TFPGXNSGYI  VWQLYHVTAC  XQGSVVRGXC  INRHSLTTSN
F6AN4      FXRFADFSHV  TFPGXNSGYI  VWQLYHVTAC  XQGSVVRGXC  INRHSLTTSY

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                               160      170      180      190      200
** *****  ***** ***** * ** *****  * *****
Ec 120 Stx1  LDLMShSGTS  LTQSVARAML  RFVTVTAXSF  TFSANTEGIS  YXTLDDLGR
F6AN1      LDXMShSGTS  LTQSVARAML  RFVTVTADXS  TFXANTEGIS  YHTLDDLGR
F6AN2      LDXMShSGTX  LTQSVARAML  RFVTVTAXSX  TFSANTEGIS  YXTLDDLGR
F6AN3      LDLMShSGTS  LTQSVARAML  RFVTVTAXSF  TFSANTEGIS  YXTLDDLGR
F6AN4      LDLMShSGTS  LTQSVARAML  RFVTVTAXSF  TFSANTEGIS  YXTLDDLGR

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                               210      220      230      240
** ** *****  *** *****  *** * *****  ***
Ec 120 Stx1  SYXNDXLKML  ILHXWGRLSX  CPAXTXHGQD  SVRVGRISFG
F6AN1      SYVNDSLKML  ILHIWGRLS-  CPACTIHGQD  SVRX-----
F6AN2      SYXNDXLKML  ILHXWGRLSX  CPAXTXHGQD  SVRVGX----
F6AN3      SYXNDXLKML  ILHXWGRLSX  CPAXTXHGQD  SVRVGRIX--
F6AN4      SYXNDXLKML  ILHXWGRLSX  CPAXTXHGQD  SVRVGRIX--

```

Figura 4 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Stx1 de *Escherichia coli* Shiga-toxigênicas isoladas de bovinos em linha de abate. Ec Stx1 – Subunidade A da toxina Stx1 de *Escherichia coli* linhagem EC120(número de acesso no GenBank: 193221234); F₆AN1, F₆AN2, F₆AN3, F₆AN4 – isolados de *E. coli* provenientes de fezes.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              110      120      130      140      150
      * *** * *****: ***** ** ***** * * ** ** **
Ec 112 Stx2 YISARCDNGF HDNGQQLYHS XNVSQRWXRS GMQISRHSXG FXHIXALMEF
C10B1      YISAXCDNGF HDNGQQLYHS XNVSQRWXRS GMQISRHSXG FYHIXALMEF
C10B2      --XARCDNGF HDNGQQLYHS XNVSQRXXRS GMQISRHSXG FXHI-ALXEF
C10B3      YISAXCDNGF HDNGQQLYHS CNVSQRW-RS GMQISRHXTG FXHIXALMEF
F1A4      -XRARCDNCF HDNGQQLYHA XNVSQRWXRS GMQISRHSXG FXHIXALMEF

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              160      170      180      190      200
      ***** ***** *** ** :* ***** **: * ** *
Ec 112 Stx2 SGNTMTRDAS RAVLRFVTVT AEALRFRXDT ERISSTVNC SCVYDDAGRR
C10B1      SGNTMTRDAS RAVLRFVTVT AEALRFRLDT ERISSTVNC SCVYDDAGRR
C10B2      SGNTMTRDAS RAVLRFVTVT AEALRFRXDT ERISSTVNC SCVYDAGXR
C10B3      SGNTMTRDAS RAVLRFVTVT AEAXRFRLDT ERISSTVNC SCVYDDAGRR
F1A4      SGNTMTRDAS RAVLRFVTVT AEALRFRXNT ERISSTVNC SCLYDDAGRR

      ....|....| ....|....|
              210      220
      ***** ** ***
Ec 112 Stx2 GPHSELGANQ QCASGVSGRG
C10B1      GPHSELGANQ QCAF-----
C10B2      GPHSELGANQ QCASGVSGRG
C10B3      GPHSELGANQ QCASGVSGRG
F1A4      GPHSELGENQ QCASGVSGRG

```

Figura 5 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Stx2 de *Escherichia coli* Shiga-toxigênicas isoladas de bovinos em linha de abate. Ec Stx2 – subunidade A da toxina Stx2 de *Escherichia coli* linhagem EC112 (número de acesso no GenBank:193221201; F₁A4 – isolado proveniente de fezes; C₁₀B1, C₁₀B2 e C₁₀B3 – isolados de *E. coli* provenientes das carcaças.

O potencial citotóxico de STEC foi verificado por meio de análise em células Vero (Figura 6). A produção da toxina tipo Shiga foi avaliada nos 18 isolados positivos para o gene *stx*. Entre esses isolados, 10 apresentaram efeito citotóxico em células Vero. Sete isolados eram de origem fecal proveniente de dois bovinos do lote A, enquanto três dos isolados eram provenientes da carcaça de um mesmo bovino (Quadro 3).

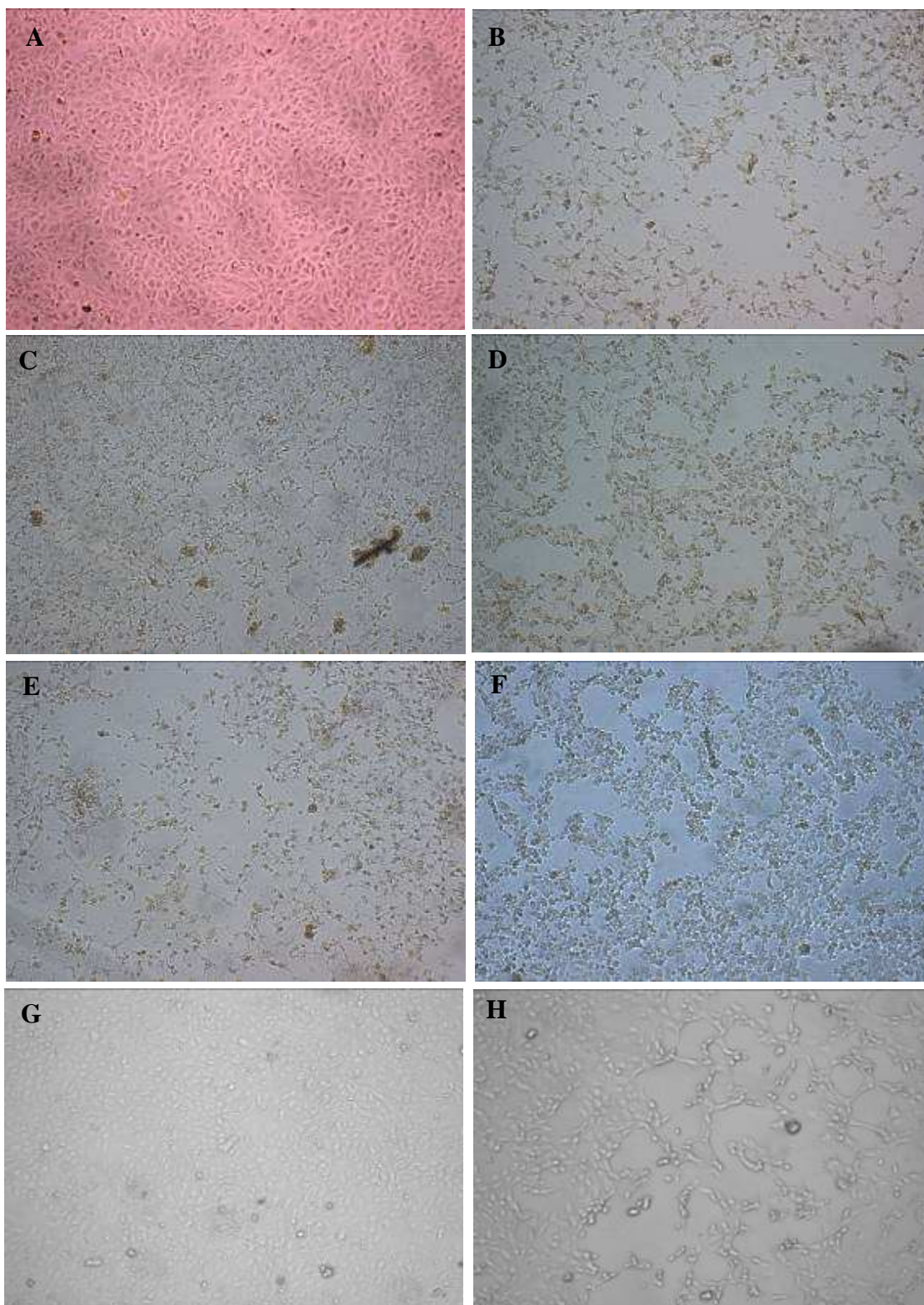


Figura 6 – Fotomicrografia do resultado do teste de Citotoxicidade, em células Vero, de isolados de *Escherichia coli* positivos para stx1/stx2, com aumento de 40x. A- branco; B- controle positivo; C, D, E- presença de efeito citotóxico; e F, G, H- ausência de efeito citotóxico.

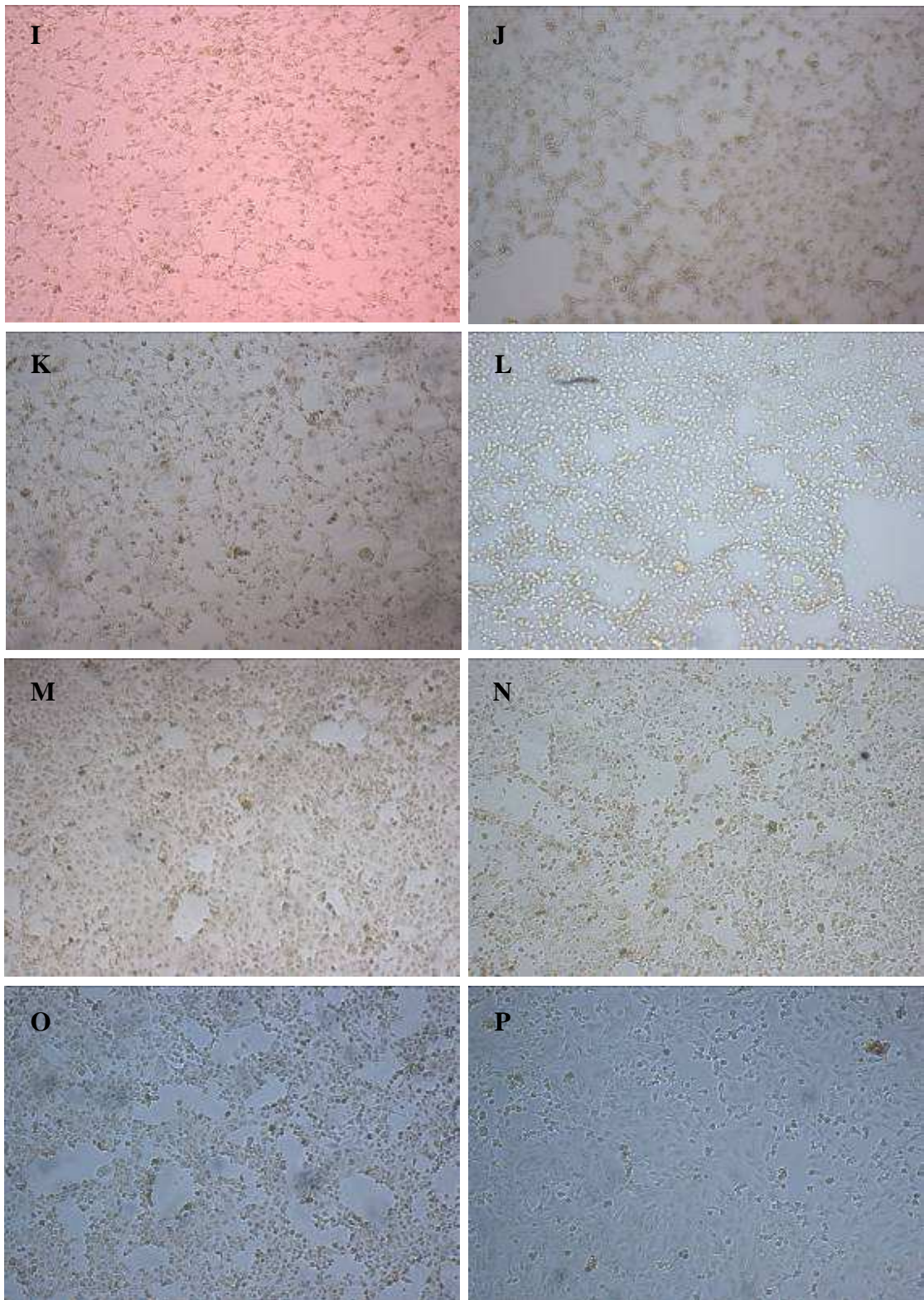


Figura 6 – Fotomicrografia do resultado do teste de Citotoxicidade, em células Vero, de isolados de *Escherichia coli* positivos para stx1/stx2, com aumento de 40x. I, J, K- presença de efeito citotóxico; e L, M, N, O, P- ausência de efeito citotóxico.

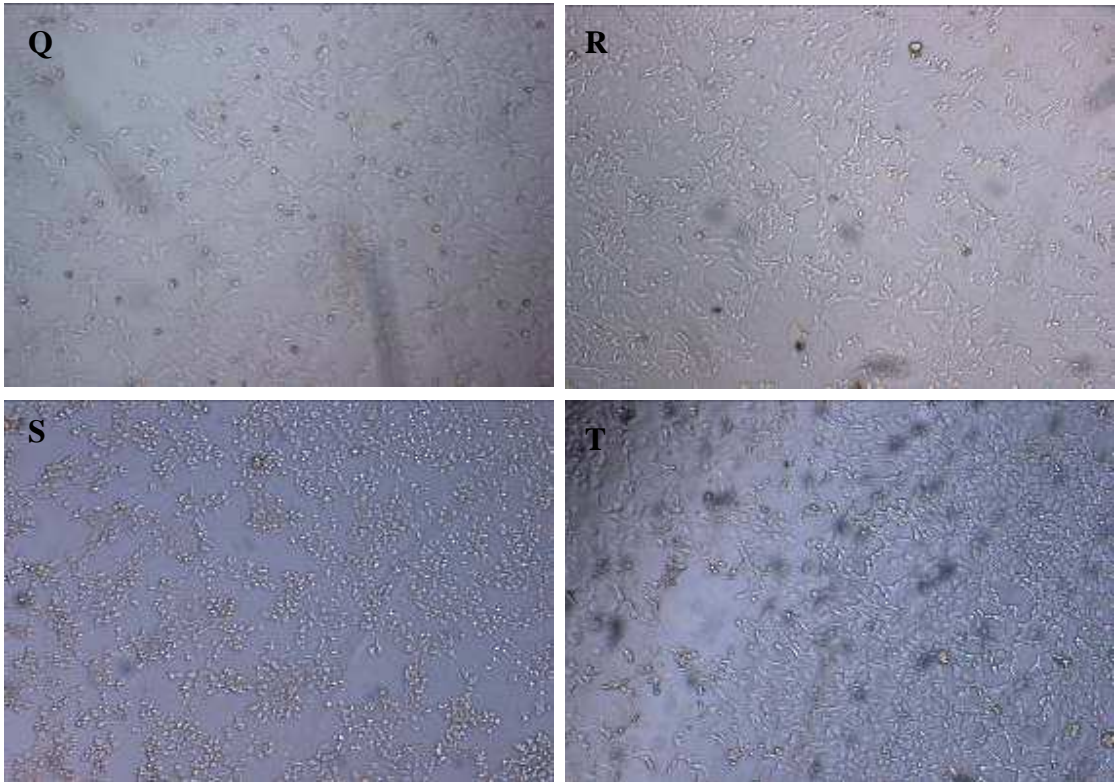


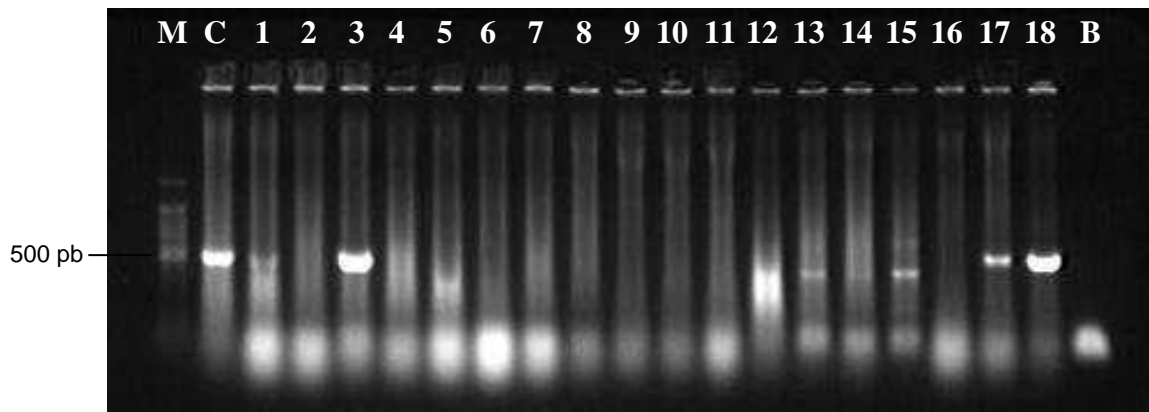
Figura 6 – Fotomicrografia do resultado do teste de Citotoxicidade, em células Vero, de isolados de *Escherichia coli* positivos para stx1/stx2, com aumento de 40x. Q, R, S, T- presença de efeito citotóxico.

Quadro 3 – Características dos isolados potencialmente shiga-toxigênicos

<i>Isolados</i>	<i>Genes de Virulência^a</i>		<i>Citotoxicidade^b</i>	<i>Entero-hemolisina^c</i>
	<i>stx</i>	<i>hly</i>	<i>Stx</i>	<i>EHly</i>
F ₆ AN1	+	-	+	+
F ₆ AN2	+	-	+	-
F ₆ AN3	+	-	+	+
F ₆ AN4	+	-	+	-
F ₁ A4	+	+	+	-
F ₁ A5	+	-	+	-
F ₁ A6	+	+	+	-
F ₃ A1	+	-	-	-
F ₄ A1	+	-	-	-
F ₄ A2	+	-	-	-
F ₄ A3	+	-	-	-
F ₄ A4	+	-	-	-
C ₇ B1	+	-	-	-
C ₇ B2	+	-	-	-
C ₇ B3	+	-	-	-
C ₁₀ B1	+	-	+	+
C ₁₀ B2	+	+	+	+
C ₁₀ B3	+	+	+	+

a Genes de virulência detectados por PCR: *stx*- toxina tipo Shiga; *hlyA*- entero-hemolisinas.
b Citotoxicidade em células vero – Stx; *c* Detecção de entero-hemolisinas – Ehly.
 C- Carcaça; F- Fezes; A- lote; B- lote; Primeiro dígito- n° do bovino; Segundo dígito- n° do isolado; e N- Novobiocina.

Os isolados positivos - *stx* foram posteriormente analisados por PCR (Figura 7) para o gene *hlyA* codificador de entero-hemolisina em STEC, o qual foi detectado nos isolados de STEC do material fecal e da carcaça, provenientes de dois bovinos (Quadro 3).



M: Marcador de tamanho – 100pb DNA Ladder; C: controle positivo (*stx*);
Linhas 1 a 18: isolados; B: Branco

Figura 7 – Análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% de *hlyA* amplificado dos isolados de STEC, provenientes de matadouro frigorífico.

A atividade entero-hemolítica foi observada em dois desses isolados (Quadro 3 e Figura 8). Ressalta-se que nem sempre houve correlação entre a presença de *hlyA* e atividade hemolítica (Quadro 3). Os resultados, nos dois casos, estão sendo submetidos a processo de confirmação; inclusive com o seqüenciamento dos positivos para *hlyA*.

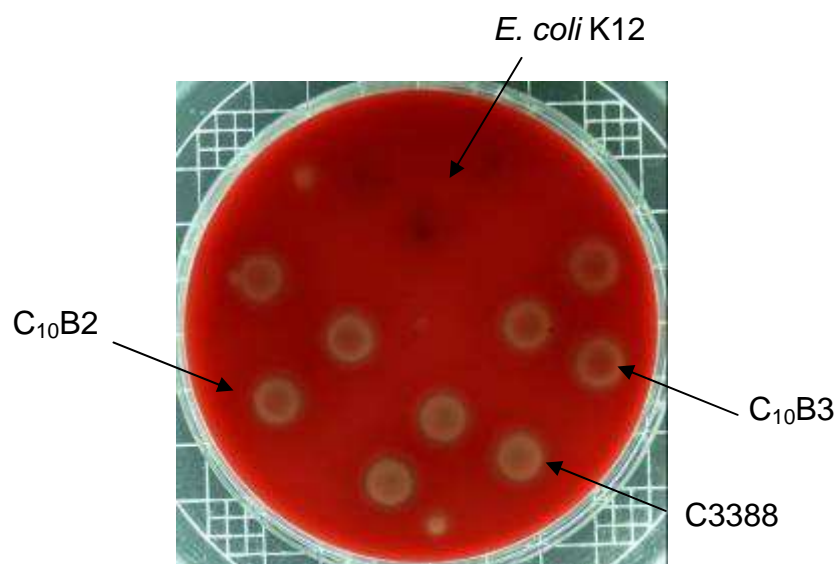


Figura 8 – Atividade de entero-hemolisinas dos isolados C₁₀B2 e C₁₀B3; Controle positivo – C3388; e Controle negativo *E. coli* K12.

A ocorrência do gene *hlyA* em estirpes STEC é alta, sugerindo-se a ação dessas duas proteínas, Stx e Ehly, na patogênese da Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH). Evidências demonstram ser *hlyA* importante marcador de virulência de STEC (SCHMIDT et al., 1995; FREMAUX et al., 2006), o qual está intimamente associado ao sorotipo O157:H7 e sorotipos não-O157, como O26:H11, O26:H-, O111:H-, O111:H8, O113:H21 (GYLES et al., 1998; GUTH et al., 2003; MEICHTRI et al., 2004; IRINO et al., 2005; CHO et al., 2006) implicados em casos esporádicos e diversos surtos. Vários autores detectaram a presença desse gene em todos os sorotipos O157:H7 de STEC e, apesar de nem todos os sorotipos não-O157 apresentarem esse gene, todas as estirpes de *E. coli* diarreicogênicas não-STECS foram negativas para o gene *hlyA* (SCHMIDT et al., 1995; OSEK, 2003; MALDONADO et al., 2005).

Na pesquisa realizada por Maldonado et al. (2005), todos os isolados *stx* positivo apresentaram efeitos citotóxicos, porém com variações na intensidade desse efeito, indicando que a presença de um gene somente não pode ser usada para determinar o potencial de virulência de estirpes.

A citotoxicidade de 220 estirpes positivas para o gene *stx* foi também avaliada por Pradel et al. (2000), e 85% delas apresentaram efeito tóxico. Observou-se significativa associação entre os isolados altamente citotóxicos e a presença do gene *stx₂* e, ou, a presença do gene *hlyA*. Um total de 202 isolados de STEC foi obtido de animais em seis fazendas de bovinos de leite no Estado de São Paulo, e apenas dois isolados não apresentaram atividade citotóxica, e na maioria deles (88%) foi detectado o gene *hlyA* (IRINO et al., 2005). A frequência de STEC foi examinada em bezerros diarreicos e não-diarreicos, e, dos 24 isolados de STEC obtidos de 20 animais, 12 foram positivos para o gene *hlyA*, sendo a expressão de Stx e de Ehly confirmada em todas as estirpes de STEC identificadas (LEOMIL et al., 2003). O potencial patogênico foi avaliado entre estirpes de STEC isoladas de animais e alimentos na Argentina e no Brasil (GUTH et al., 2003). O gene *hlyA* foi encontrado em 85,7% dos isolados, e a produção da entero-hemolisina (EHEC-Hly) foi observada em todas as estirpes O157 e 85,7% das não-O157 (GUTH et al., 2003).

O bovino é o reservatório principal de STEC O157 e não-O157. A microbiota presente no intestino de bovinos pode contaminar o ambiente de abate e processamento das carcaças e, conseqüentemente, o produto final. A pele e fezes são importantes fontes de contaminação bacteriana de carcaças, entretanto intervenções antimicrobianas podem significativamente reduzir o número de bactérias de origem fecal. Vários autores têm demonstrado a ocorrência das STEC em fezes, pele e carcaças de bovinos na linha de abate. A pele foi considerada fonte importante de STEC em lotes de bovinos criados em confinamento (BARKOCY-GALLAGHER et al., 2003), o que foi demonstrado pela maior detecção de STEC O157:H7 e não-O157 em comparação com as fezes desses bovinos. Nos resultados aqui apresentados, não se detectou STEC na pele dos bovinos amostrados. A diferença dos resultados pode ser atribuída à prática de criação de bovinos em pastagens, fator que minimizaria os eventos de contaminação.

Justifica-se um estudo mais amplo com a finalidade de análise do risco real de STEC em produtos de carne bovina.

5. CONCLUSÕES

Escherichia coli Shiga-toxigênica foi detectada em fezes e carcaças de bovino, em Matadouro Frigorífico.

O meio seletivo mEC foi mais eficaz para o isolamento quando desprovido de Novobiocina, entretanto o uso desse antibiótico permitiu a detecção de isolados de *E. coli* que não são necessariamente detectados na ausência de Novobiocina. A recíproca parece ser verdadeira, portanto é válido recomendar que, em testes de presença de *Escherichia coli* Shiga-toxigênica, seja usado meio – mEC com Novobiocina e também mEC sem Novobiocina.

STEC foi detectada apenas em fezes e carcaças dos bovinos, mas não nas amostras de pele dos animais abatidos que foram criados em regime de pastoreio. Infere-se que o sistema de criação dos animais pode influenciar a presença de STEC, uma vez que, em trabalhos nos quais a amostragem foi feita em animais confinados, a pele aparece como a principal fonte. Esse fato deve ser considerado em Análise de Risco.

Oito dos 18 amplicons *stx* obtidos foram seqüenciados, e todos apresentaram seqüências de aminoácidos inferidas das seqüências nucleotídicas correspondentes às toxinas Stx, sendo quatro Stx1, de isolados detectados na presença de Novobiocina, e quatro Stx2, considerados de maior virulência, isolados na ausência de Novobiocina.

Nem todos os isolados positivos para *stx* pelo método de PCR foram capazes de expressar a citotoxicidade para as células Vero.

A relação entre a presença de *hly* e a atividade hemolítica nem sempre ocorre. Essa atividade foi confirmada em cinco dos isolados, todos eles também positivos para a atividade citotóxica. A recíproca não é verdadeira, pois nem todos com atividade de Stx tiveram atividade de EHly.

Os resultados autorizam recomendar a ampliação de estudos com a finalidade de análise de riscos pertinentes à ocorrência e disseminação desse grupo de bactérias de expressiva relevância para a Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

- AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 297-306, 2007.
- AL-GALLAS, N.; BEN AISSA, R.; ANNABI, T.A.; BAHRI, O.; BOUDABOUS, A. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. **Food Microbiology**, v 19, p. 389-398, 2002.
- APHA – Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. Edited by Frances Pouch Downes, Keith ITO. **American Public Health Association**, 2001.
- BANATVALA, N.; DEBEUKELAER, M.M.; GRIFFIN, P.M.; BARRETT, T.J.; GREENE, K.D.; GREEN, J.H. Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: a family outbreak. **Journal of Pediatric Infections Diseases**, v.15, p. 1008-1011, 1996.
- BETTELHEIM, K.A. Role of non-O157 VTEC. **Journal Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 38-50, 2000.
- BEUTIN, L. et al. Close Association of Verotoxin (Shiga-Like Toxin) Production with Enterohemolysin Production in Strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2559-2564, 1989.
- BLANCO, M. et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 309-319, 1997.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M.P.; DAHBI, G.; BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **Journal Clinical Microbiol.**, v. 41, p.1351-1356, 2003.

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

BUCHANAN, R.L.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other entero-hemorrhagic *E. coli*. **Institute of Food Technology**, v. 51, p. 69-76, 1997.

CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T.; CAUDURO, P.F.; DIAS, C.A.G.; MEZZARI, A.; BRODT, T. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 266-270, 2000.

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

CATARAME, T.M.G. et al. Optimization of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 949-957, 2003.

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

CHO, S.; DIEZ-GONZALES, F.; FOSSLER, C.P.; WELLS, S.J.; HEDBERG, C.W.; KANEENE, J.B.; RUEGG, P.L.; WARNICK, L.D.; BENDER, J.B. Prevalence of shiga toxin-encoding bacteria and shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from dairy farms and county fairs. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 289-298, 2006.

CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE (CCFH). Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. Draft guidelines at step 8 of procedure. Alinorm 99/13A, Appendix II, Report of the thirty-first session. **Codex Alimentarius Commission**, Rome, Italy, 1998.

CRISTANCHO, L.; JOHNSON, R.P.; MCEWEN, S.A.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* in white veal calves. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 200-209, 2008.

DESMARCHELIER, P. et al. Managing safety and quality through the red meat chain. **Meat Science**, v. 77, p. 28-35, 2007.

DONNENBERG, M.S.; WHITTAM, T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 539-548, 2001.

DOYLE, M.P. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p.2394-2396, 1997.

DUFFY, G.; LYNCH, O.A.; CAGNEY, C. Tracking emerging zoonotic pathogens from farm to fork. **Meat Science**, 2007.

EUROPEAN UNION RISK ANALYSIS INFORMATION NETWORK (EURAIN). **A Review of Epidemiology**, 2004.

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

FRASER, M.E.; FUJINAGA, M.; CHERNEY, M.M.; MELTON-CELSA, A.R.; TWIDDY, E.M.; O'BRIEN, A.D.; JAMES, M.N.G. Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 26, p. 27511-27517, 2004.

FREMAUX, B.; RAYNAUD, S.; BEUTIN, L.; ROZAND, C.V. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 180-191, 2006.

GILBERT, R.A.; DENMAN, S.E.; PADMANABHA, J.; FEGAN, N.; AJMI, D.A.; MCSWEENEY, C.S. Effect of diet on the concentration of complex Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and EHEC virulence genes in bovine faeces, hide and carcass. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 208-216, 2008.

GIRARDEAU, J.P.; DALMASSO, A.; BERTIN, Y.; DUCROT, C.; BORD, S.; LIVRELLI, V.; VERNIZY-ROZAND, C.; MARTIN, C. Association of Virulence Genotype with Phylogenetic Background in Comparison to Different Serotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 6098-6107, 2005.

GONTHIER, A. et al. Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 352-356, 2001.

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

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.L.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome. **Brazil Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 535-536, 2002.

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

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

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

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS OF FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities**. 2nd ed. Originally published by Chapman & Hall, 1998. 736 p. 2005. (ISBN: 978-0-306-48675-3).

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

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; 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. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 446-447, 2002.

KARMALI, M.A. Use de comparative genomics as a tool to assess the clinical and public health significance of emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes. **Meat Science**, v. 71, p. 62-71, 2005.

KARMALI, M.A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R. et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4930-4940, 2003.

KHAN, A. et al. Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection: current progress & future challenges. **Indian J. Med. Res.**, v. 118, p. 1-24, 2003.

KOOHMARAIE, M.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; GUERINI, M.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L. Interventions to reduce/eliminate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Meat Science**, v. 77, p. 90-96, 2007.

KOOHMARAIE, M.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; GUERINI, M.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. **Meat Science**, v. 71, p. 79-91, 2005.

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

KUMAR, H.S.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*(STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 334-338, 2001.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. **Risk profile**: Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in red meat and meat products. [S.l. : s.n.], 2002.

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

LOIRAT, C.; SONSINO, E.; MORENO, A.V.; PILLION, G.; MERCIER, J.C.; BEAUFILS, F. Hemolytic uremic syndrome: an analysis of the natural history and prognostic features. **Acta Pediatric Scandinavia**, v. 73, p. 505-514, 1984.

MALDONADO, Y.; FISER, J.F.; NAKATSU, C.H.; BHUNIA, A.K. Cytotoxicity Potential and Genotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Environmental and Food Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1890-1898, 2005.

MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRE, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLEMI, G.; GUTH, B.E.C.; MASANA, M.O.; CATALDI, A.; RODRIGUES, H.R.; RIVAS, M. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina**: prevalence and virulence properties. Buenos Aires, 2004. v. 96, 198 p.

MIDGLEY, J.; DESMARCHELIER, P. Pre-slaughter handling of cattle and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 307-311, 2001.

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

MORA, A. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-9, 2007.

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

OSEK, J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1217-1225, 2003.

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

PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; CHAMPS, C.; PALCOUX, J.P.; REYNAUD, A.; SCHEUTZ, F.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Food, and Children during a One-Year Prospective Study in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1023-1031, 2000.

PRATA, L.F.; FUKUDA, R.T. **Fundamentos de Higiene e Inspeção de Carnes**. Jaboticabal, SP: UNESP, 2001.

ROOPNARINE, R.R.; AMMONS, D.; RAMPERSAD, J.; ADESIYUN, A.A. Occurrence and Characterization of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) Strains from Dairy Farms in Trinidad. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 78-85, 2007.

SABLET, T.; BERTIN, Y.; VAREILLE, M.; GIRARDEAU, J.P.; GARRIVIER, A.; GOBERT, A.P.; MARTIN, C. Differential expression of *stx*₂ variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. **Microbiology**, v. 154, p. 176-186, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Harbor Laboratory, 1989.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1055-1061, 1995.

SIEGLER, R.L.; GRIFFIN, P.M.; BARRETT, T.J.; AND STROCKBINE, N.A. Recurrent hemolytic uremic syndrome secondary to *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Journal of Pediatric**, v. 91, p. 666-668, 1993.

SIEGLER, R.L.; MILLIGAN, M.K.; BURNINGHAM, T.H.; CHRISTOFFERSON, R.D.; CHANG, S.Y.; JORDE, L.B. Long-term outcome and prognostic indicators in the hemolytic uremic syndrome. **Journal of Pediatric**, v. 118, p.195-200, 1991.

SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M. **Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Vero cytotoxin producing strains.** [S.l. : s.n.], 1993.

TORRES, A.G.; ZHOU, X.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 18-29, 2005.

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

TOZZI, A.E.; CAPRIOLI, A.; MINELLI, F.; GIANVITI, A.; DE PETRIS, L.; EDEFONTI, A. Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* Infections Associated with Hemolytic Uremic Syndrome, Italy, 1988-2000. **Emerging Infections Disease**, v. 9, p. 106-108, 2003.

TROMPETER, R.S.; SCHWRTZ, R.; CHANTLER, C.; DILLON, M.J.; HAYCOCK, G.B.; KAY, R. Haemolytic uraemic syndrome: an analysis of prognostic features. **Archives of Disease in Childhood**, v. 58, p.101-105, 1983.

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

VIMONT, A. et al. Growth of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 274-281, 2007.

VIMONT, A.; VERNOZY-ROZAND & DELIGNETTE-MULLER, M.L. Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p.102-108, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Application of risk analysis to food standards issues.** [S.l.]: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1995. (WHO/FNU/FOS/Report no.95.3).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Media Centre. **Fact sheet n°125** . Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Maio 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/index.htm>>. Acesso em: 06 jan. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Media Centre. **Fact sheet n° 237**. Food safety and foodborne illness. Março 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 06 abril 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998. (Report of a WHO Scientific Working Group Meeting).

WATTERWORTH, L.; TOPP, E.; SCHRAFT, H.; LEUNG, K.T. Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 93-105, 2005.

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

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 1A – Características dos isolados de *Escherichia coli* provenientes da pele bovina

Isolado	Fatores de Virulência ^a		Fenótipo ^b Stx	Fenótipo ^c Ehly	Isolado	Fatores de Virulência ^a		Fenótipo ^b Stx	Fenótipo ^c Ehly
	<i>stx</i>	<i>hly</i>				<i>stx</i>	<i>hly</i>		
P ₇ AN1	-				P ₅ A2	-			
P ₇ AN2	-				P ₅ A3	-			
P ₈ AN1	-				P ₅ A4	-			
P ₈ AN2	-				P ₅ A5	-			
P ₈ AN3	-				P ₇ A1	-			
P ₉ AN1	-				P ₇ A2	-			
P ₉ AN2	-				P ₇ A3	-			
P ₉ AN3	-				P ₈ A1	-			
P ₉ AN4	-				P ₈ A2	-			
P ₉ AN5	-				P ₈ A3	-			
P ₉ AN6	-				P ₈ A4	-			
P ₁₀ AN1	-				P ₉ A1	-			
P ₁₀ AN2	-				P ₉ A2	-			
P ₁₀ AN3	-				P ₉ A3	-			
P ₁₀ AN4	-				P ₁₀ A1	-			
P ₁₀ AN5	-				P ₁₀ A2	-			
P ₁₀ AN6	-				P ₁₀ A3	-			
P ₁ BN1	-				P ₃ B1	-			
P ₁ BN2	-				P ₃ B2	-			
P ₁ BN3	-				P ₃ B3	-			
P ₁ BN4	-				P ₄ B1	-			
P ₂ BN1	-				P ₄ B2	-			
P ₂ BN2	-				P ₄ B3	-			
P ₂ BN3	-				P ₄ B4	-			
P ₃ BN1	-				P ₄ B5	-			
P ₃ BN2	-				P ₄ B6	-			
P ₄ BN1	-				P ₅ B1	-			
P ₄ BN2	-				P ₅ B2	-			
P ₄ BN3	-				P ₅ B3	-			
P ₄ BN4	-				P ₅ B4	-			
P ₄ BN5	-				P ₅ B5	-			
P ₅ BN1	-				P ₅ B6	-			
P ₅ BN2	-				P ₅ B7	-			
P ₅ BN3	-				P ₅ B8	-			
P ₆ BN1	-				P ₅ B9	-			
P ₆ BN2	-				P ₆ B1	-			
P ₆ BN3	-				P ₆ B2	-			
P ₇ BN1	-				P ₆ B3	-			
P ₇ BN2	-				P ₆ B4	-			
P ₇ BN3	-				P ₆ B5	-			
P ₈ BN1	-				P ₆ B6	-			
P ₈ BN2	-				P ₆ B7	-			
P ₈ BN3	-				P ₆ B8	-			
P ₂ A1	-				P ₆ B9	-			
P ₂ A2	-				P ₇ B1	-			
P ₂ A3	-				P ₇ B2	-			
P ₂ A4	-				P ₇ B3	-			
P ₅ A1	-								

^a Genes de virulência detectados por PCR: *stx*- toxina tipo Shiga; *hlyA*- entero-hemolisinas.

^b Citotoxicidade em células vero – Stx; e ^c Detecção de entero-hemolisinas – Ehly.

P- pele; A- lote; B- lote; Primeiro dígito- N° do bovino; Segundo dígito- n° do isolado; e N- Novobiocina.

ANEXO 2

Tabela 2A – Características dos isolados de *E. coli* provenientes de fezes bovinas

Isolado	Fatores de Virulência ^a		Fenótipo ^b Stx	Fenótipo ^c Ehly	Isolado	Fatores de Virulência ^a		Fenótipo ^b Stx	Fenótipo ^c Ehly
	<i>stx</i>	<i>hly</i>				<i>stx</i>	<i>hly</i>		
F ₁ AN1	-				F ₁₀ BN4	-			
F ₁ AN2	-				F ₁₀ BN5	-			
F ₁ AN3	-				F ₁₀ BN6	-			
F ₁ AN4	-				F ₁ A1	-			
F ₂ AN1	-				F ₁ A2	-			
F ₂ AN2	-				F ₁ A3	-			
F ₂ AN3	-				F ₁ A4	+	+	+	
F ₂ AN4	-				F ₁ A5	+	-	+	
F ₃ AN1	-				F ₁ A6	+	+	+	
F ₃ AN2	-				F ₁ A7	-			
F ₃ AN3	-				F ₂ A1	-			
F ₅ AN1	-				F ₃ A1	+			
F ₅ AN2	-				F ₃ A2	-			
F ₅ AN3	-				F ₃ A3	-			
F ₅ AN4	-				F ₄ A1	+			
F ₅ AN5	-				F ₄ A2	+			
F ₅ AN6	-				F ₄ A3	+			
F ₆ AN1	+	-	+		F ₄ A4	+			
F ₆ AN2	+	-	+		F ₄ A5	-			
F ₆ AN3	+	-	+		F ₅ A1	-			
F ₆ AN4	+	-	+		F ₅ A2	-			
F ₆ AN5	-				F ₅ A3	-			
F ₁ BN1	-				F ₇ A1	-			
F ₁ BN2	-				F ₇ A2	-			
F ₁ BN3	-				F ₈ A1	-			
F ₂ BN1	-				F ₈ A2	-			
F ₂ BN2	-				F ₈ A3	-			
F ₂ BN3	-				F ₈ A4	-			
F ₃ BN1	-				F ₁ B1	-			
F ₄ BN1	-				F ₁ B2	-			
F ₄ BN2	-				F ₁ B3	-			
F ₄ BN3	-				F ₂ B1	-			
F ₅ BN1	-				F ₂ B2	-			
F ₅ BN2	-				F ₃ B1	-			
F ₅ BN3	-				F ₃ B2	-			
F ₇ BN1	-				F ₃ B3	-			
F ₇ BN2	-				F ₆ B1	-			
F ₇ BN3	-				F ₆ B2	-			
F ₈ BN1	-				F ₆ B3	-			
F ₈ BN2	-				F ₇ B1	-			
F ₈ BN3	-				F ₇ B2	-			
F ₉ BN1	-				F ₇ B3	-			
F ₉ BN2	-				F ₈ B1	-			
F ₉ BN3	-				F ₈ B2	-			
F ₉ BN4	-				F ₈ B3	-			
F ₁₀ BN1	-								
F ₁₀ BN2	-								
F ₁₀ BN3	-								

^a Genes de virulência detectados por PCR: *stx*- toxina tipo Shiga; *hlyA*- entero-hemolisinas.

^b Citotoxicidade em células vero – Stx; e ^c Detecção de entero-hemolisinas – Ehly.

P- pele; A- lote; B- lote; Primeiro dígito- n° do bovino; Segundo dígito- n° do isolado; e N- Novobiocina.

ANEXO 3

Tabela 3A – Características dos isolados de *E. coli* provenientes de carcaça bovina

Isolado	Fatores de Virulência ^a		Fenótipo ^b Stx	Fenótipo ^c Ehly	Isolado	Fatores de Virulência ^a		Fenótipo ^b Stx	Fenótipo ^c Ehly
	<i>stx</i>	<i>hly</i>				<i>stx</i>	<i>hly</i>		
C ₃ AN1	-				C ₇ B3	+	-	-	
C ₃ AN2	-				C ₉ A1	-			
C ₃ AN3	-				C ₉ A2	-			
C ₃ AN4	-				C ₉ A3	-			
C ₃ AN5	-				C ₉ A4	-			
C ₃ AN6	-				C ₉ A5	-			
C ₃ AN7	-				C ₉ A6	-			
C ₃ AN8	-				C ₉ A7	-			
C ₁₀ AN1	-				C ₉ A8	-			
C ₂ A1	-				C ₉ A9	-			
C ₂ A2	-				C ₁₀ A1	-			
C ₂ A3	-				C ₁₀ A2	-			
C ₂ A4	-				C ₁₀ A3	-			
C ₂ A5	-				C ₁₀ A4	-			
C ₂ A6	-				C ₁₀ A5	-			
C ₇ A1	-				C ₁₀ A6	-			
C ₇ A2	-				C ₁₀ A7	-			
C ₇ A3	-				C ₁₀ A8	-			
C ₇ A4	-				C ₁₀ A9	-			
C ₇ A5	-				C ₁₀ B1	+	-	+	
C ₇ B1	+	-	-		C ₁₀ B2	+	+	+	
C ₇ B2	+	-	-		C ₁₀ B3	+	+	+	

^a Genes de virulência detectados por PCR: *stx*- toxina tipo Shiga; *hlyA*- entero-hemolisinas.

^b Citotoxicidade em células vero – Stx; e ^c Detecção de entero-hemolisinas – Ehly.

C- Carcaça; A- lote; B- lote; Primeiro dígito- N°do bovino; Segundo dígito- n°do isolado; e N- Novobiocina.