



<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140009>
<http://www.higieneanimal.ufc.br>

Artigo Científico

Prevalência e genotipagem de *Escherichia coli* patogênica em carcaças de suínos abatidos em frigoríficos comerciais na Região Sul do Brasil

Prevalence and genotyping of pathogenic Escherichia coli on carcasses of pigs slaughtered in commercial slaughterhouses in southern region of Brazil

Luis Alberto Pereira Machado¹, Franciele Lucca¹, Jayse Alves², Adriane Pozzobon^{1,2}, Ivan Cunha Bustamante-Filho^{1,2}

RESUMO: A carne suína representa importante fonte de proteína animal para o mundo, porém vem sendo associada a surtos de toxinfecção alimentar. Uma das causas destes surtos é a contaminação por *Escherichia coli*, encontrada no trato intestinal e ambiente dos suínos abatidos para produção de carnes *in natura* e industrializadas. No contexto de segurança alimentar, os surtos por *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são os melhores documentados. Diversos surtos causados por ingestão de alimentos de origem animal foram documentados. Contudo, no Brasil, existem poucos dados sobre a ocorrência deste patógeno em suínos e, conseqüentemente, na carne de porco. O objetivo deste trabalho foi quantificar a contaminação por *E. coli* de carcaças suínas abatidos em abatedouros comerciais localizados nos estados da Região Sul do Brasil, e identificar por PCR a presença de *E. coli* produtora das toxinas Shiga e Intimina. Foram realizados swabs de 272 carcaças suínas em abatedouros localizados nos estados do RS, SC e PR. Foram identificadas contaminações por *E. coli* em 25 carcaças, sendo 20 no abatedouro do RS e cinco no abatedouro paranaense. Das amostras positivas foram extraídos DNA para genotipagem por PCR. Nenhuma amostra apresentou o gene *stx1*, porém o gene *eaeA* foi identificado em 13 amostras, nas diferentes regiões da carcaça. A técnica de PCR pode ser uma ferramenta útil no rastreamento da contaminação bacteriana ao longo dos processos do abatedouro, podendo auxiliar na redução da incidência dos casos de toxinfecções alimentares causadas por *E. coli* e outros microorganismos.

Palavras Chaves: carne suína, *E. coli*, STEC, toxina Shiga, PCR, toxinfecção alimentar.

ABSTRACT: The pork is an important source of animal protein for the world, however it's associated to food poisoning outbreaks. One of the causes of such episodes is the contamination by *Escherichia coli*, that can be found in the intestinal tract and environment of pigs slaughtered for production of “*in natura*” and industrialized meat. In the context of food safety, outbreaks of *Escherichia coli* that producing Shiga toxin (STEC) are the best documented. In the context of food security, outbreaks of *Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC) are well documented. However, there are few data about the occurrence of this pathogen in swine and pork meat in Brazil. The aim of this study was to quantify contamination by *E. coli* of swine carcass slaughtered in abattoirs located in the Southern region of Brazil and to identify by PCR the presence of shiga toxin and intimin producing *E. coli*. Swabs of 272 swine carcasses were performed in slaughterhouses of RS, SC and PR States. A total of 25 carcasses were contaminated, 20 at RS and 5 at PR. DNA was extracted of positive samples for genotyping by PCR. None of the samples were positive for *stx1* gene, however 13 samples were positive for the *eaeA* gene in different parts of the carcass. The PCR technique can be a useful tool for screening microbiological contamination through slaughter, helping to reduce the occurrence of foodborne infections outbreaks caused by *E. coli* and other microorganisms.

Key Words: Pork , *E. coli* , STEC , Shiga toxin , PCR , food poisoning

Autor para correspondência. E. Mail: *Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES

Recebido em 12.12.2013. Aceito em 29.3. 2014

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES

² Centro de Ciências da Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES

Introdução

A ingestão de alimentos contaminados tem como resultado final os surtos de toxinfecção alimentar, devido, principalmente, a falhas no processo de

fabricação, elaboração, conservação, exposição ou consumo de alimentos (PINTO & BERGMANN, 2000). A carne suína é um dos alimentos responsáveis por estes surtos, podendo sua origem estar

relacionada à presença da *Escherichia coli* (*E. coli*) que é uma bactéria possível de ser encontrada no trato intestinal dos animais abatidos e utilizados para a produção de carnes *in natura* e industrialização de produtos, como presuntos, salsichas, mortadelas, salames, entre outros (GERMANO & GERMANO, 2003; MARGALL et al., 1997).

O número reduzido de registros de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil prejudica a demonstração estatística dos surtos ocorridos. Dados estatísticos de outros países demonstram o aumento de casos de DTA, principalmente pela oferta de produtos industrializados com origem em produtos a base de proteína animal. As carnes são consideradas grandes hospedeiros de bactérias patogênicas, entre elas a *E. coli*. Embora os dados demonstrem oscilação e até uma tendência de redução dos surtos nos últimos anos, estes números estão também relacionados com o consumo de carnes contaminadas por *E. coli*, que ocupa

o terceiro lugar no país como agente etiológico responsável por surtos alimentares (SVS/MS, 2011).

A *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é reconhecida como um importante grupo de patógenos emergentes e de elevado grau de infectividade, mesmo em quantidades pequenas (10 UFC). Estas bactérias tem sido o foco de atenção e da captação de informações sobre sua epidemiologia e seus reservatórios, devido ao aumento de ocorrência de surtos alimentares por ela causados em todo o mundo. As estimativas demonstram que, nos Estados Unidos (EUA) a STEC, oriunda da carne bovina, foi a protagonista de 10.000 a 20.000 episódios anuais de DTA e a responsável por cerca de 200 a 500 óbitos, evidenciados mais frequentemente em crianças e jovens (BROTAM et al., 1995).

Soma-se isto ao fato delas estarem direta ou indiretamente ligadas a cadeia alimentar dos seres humanos, responsabilizando-se pela causa de graves

doenças ligadas ao consumo de carnes (WHO, 1998). Embora os suínos não sejam considerados uma importante fonte desta toxina, pois sua prevalência é considerada baixa nesta espécie (FAIRBROTHER & NADEAEU, 2006), a STEC já foi isolada em carne suína e produtos derivados envolvidos em infecções de seres humanos (BOUVET et al., 2002).

A capacidade da STEC de causar doenças graves está relacionada com a produção de um ou mais tipos de toxina Shiga, sua presença além de atuar como fontes de contaminação dos animais pode também causar contaminações através de presença de fezes (Gyles, 2007) podendo disseminá-la nos abatedouros (BOUVET et ali., 2002).

MENG et al. (1998) demonstraram a direta relação entre a presença do gene *eae* e a capacidade da STEC em causar doenças graves nos seres humanos. O gene *eae* codifica a proteína externa de membrana Intimina um fator de virulência

mediador no ataque ao enterócito. Produz uma lesão intestinal do tipo “attaching and effacing” (AE); “attaching” que indica íntima adesão ao enterócito e “effacing”, desaparecimento das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal (WILLSHAW et al., 1994, CHINA et al., 1996). Em humanos, STEC *eae* positivos estão relacionados a quadros severos de diarreia, principalmente Colite Hemorrágica (HC) e Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU) (KARMALI, 1989; PATON & PATON, 1998).

A partir do relato de surto causado por STEC no ano de 1982, a linhagem foi associada a um amplo espectro de doenças no ser humano, variando de diarreia branda a complicações graves como a SHU (NATARO & KAPER, 1998), sendo este agente, considerado como a principal causa da insuficiência renal aguda em crianças nos EUA (KENSH & ACHECON, 2002).

Os casos de diarreia por STEC excederam 2% em países como Alemanha, Noruega, Suíça e Áustria, enquanto que na

Itália foi menor que 1%, sendo que a maior incidência de SHU no continente Europeu está na Alemanha com 19 casos para cada 100.000 crianças até 15 anos (CAPRIOLI & TOZZI, 1998). O Canadá em 1991 foi registrado o maior surto de infecção por STEC já ocorrido no mundo, onde foram notificados 521 casos entre os esquimós, sendo 22 casos de SHU e duas mortes (SPIKA et al.,1998). No Japão, entre 1991 a 1995, ocorreram 29 surtos provocados por *E. coli*, dos quais quatro destes surtos ocorreram em jardins de infância, seis ocorreram em escolas primárias e 19 ocorreram entre familiares (MICHINO et al.,1998). Em Michigan, nos EUA, foi realizado estudo das STEC isoladas entre 2000 e 2005, onde foram avaliados mais de 389 pacientes com STEC, com diarreia sanguinolenta ou SHU (MANNING et al.,2007).

A maior incidência de SHU em crianças de até quatro anos, nos últimos 30 anos, foi apontada na Argentina, onde os casos de SHU ocorridos apresentam-se de

7 a 10 vezes mais altos do que os relatados em outras partes do mundo. Na Argentina 80% da carne consumida não passa por controles e inspeção adequada, o que justifica a alta incidência de infecções por STEC (LOPEZ et al.,1998).

No Brasil são poucas as informações disponíveis sobre o assunto, embora sejam reconhecidos casos esporádicos de diarreia provocados pela STEC que ocorrem com mais frequência em crianças (PATON & PATON, 1998), estudos realizados em São Paulo e no Paraná utilizando fezes de crianças com diarreia apontam frequência de STEC de aproximadamente 1%. Surtos associados à STEC ainda não foram confirmados no país (GUTH et al., 2002; Toni et al., 2004).

A emergência deste patógeno gerou grande preocupação mundial, pelo número de pessoas afetadas e por distintos veículos de transmissão identificados (ressaltando produtos de origem animal), o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a promover medidas de controle e

prevenção. Contudo a identificação de STEC é feito principalmente pela imunodeteção das toxinas nos isolados, técnica laboriosa e demorada (GYLES, 2007). Assim, novos métodos vem sendo buscados para rápida identificação do patógeno.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos principais métodos moleculares utilizados para detecção de STEC (PARK et al., 1999), apresentando como vantagens a especificidade e sensibilidade bem como a rapidez na sua execução da técnica (PATON & PATON, 1998). A desvantagem está na presença de inibidores da reação presentes na própria amostra e a facilidade de contaminação durante o processo (BRIAN et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi identificar a contaminação de carcaças suínas abatidas em abatedouros frigoríficos comerciais localizados nos estados que compõem a Região Sul do país - Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e

Paraná (PR) pela presença de STEC e Intiminas, através da detecção por PCR.

Material e Métodos

Coleta de Amostras

As amostras de *swabs* de carcaça de suínos (n=272) foram coletadas em três abatedouros frigoríficos comerciais localizados nos estados do RS, SC e PR. A obtenção das amostras ocorreu nos meses de março e abril de 2013, considerando as normas de higiene e segurança dos alimentos em processo normal de abate de suínos destes estabelecimentos. O recolhimento amostral foi realizado seguindo a norma de coleta e acondicionamento de amostras definida pela Circular N° 130 de 2007 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo os swabs preparados e analisados microbiologicamente para *E.coli* em Placla Petrifilm™ e posteriormente, sua identificação realizada por PCR.

Para estimar a prevalência da

STEC, o tamanho adequado de amostra estatisticamente foi calculado com base no número de animais abatidos (980.000 por ano) nestes estabelecimentos, numa prevalência esperada de 5%, em nível de confiança de 95% e para uma precisão de 5%, utilizando o Win Episcopo 2.0 (Universidad de Zaragoza, Espanha). Desta forma, as amostras foram constituídas aleatoriamente de 30 carcaças de suínos para o estabelecimento do RS e 19 para os estabelecimentos de SC e PR, obtidas aleatoriamente em diversos dias e horários de coleta. As amostras de swabs superficiais de carcaças foram coletadas em quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga, paleta e papada) no mesmo ponto no frigorífico, após o Ponto Crítico de Controle Biológico (PCCB), totalizando 120 amostras para a coleta de 30 carcaças e 76 para as coletas de 19 carcaças.

A área amostrada para coleta na superfície das carcaças foi delimitada por molde estéril de aço inox com área interna livre de 10 cm² por ponto de coleta, onde

foram efetuados os esfregaços com uso de *swabs*, devidamente esterilizados e previamente umedecidos em solução fisiológica peptonada 0,1 %.

Diagnostico microbiológico para *E. coli*

As amostras foram submetidas ao protocolo de extração de DNA por proteinase K (DE GRACIA, 1997) e por PCR para identificação microbiológica. Para a PCR foi utilizado como controle positivo o DNA na concentração de 2×10^{-5} Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Preparo da amostra para análise em Placas Petrifilm™

A amostra em *swab* foi preparada numa diluição de 1:10 ou superior da amostra em recipiente estéril. Foi adicionada a quantidade adequada de um dos diluentes estéreis a seguir: tampão fosfato de Butterfield, água peptonada 0,1%, diluente salina peptonada (método ISO 6887), água peptonada tamponada (método ISO 6887-1), solução salina (0,85-090%), caldo letheen sem bissulfito

ou água destilada. O ensaio na placa Placa Petrifilm™ seguiu as recomendações do fabricante. As placas foram incubadas a 37° C, com a face transparente para cima, em pilhas de até 20 placas (3M™ Petrifilm™, Brasil), sendo quantificadas em um contador de colônias comum.

Extração de DNA das amostras

Para a extração do DNA utilizou-se o caldo do swab empregado na preparação do petrifilm (adaptado de De Gracia, 1997). Em 200 µL de caldo e acrescentou-se 20 µL de Tween 20, seguido de centrifugação a 12000 x g por 10 min a 20°C. Suspendeu-se o sedimento em 300 µL de tampão de lise [60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30 µL de SDS a 10%, 15 µL de proteinase K (20 mg/mL), 195 µL de água ultra-pura], incubando por 1 h a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de fenol tamponado (pH 8,0) e centrifugado a 12.000 x g por 5 min, após a centrifugação transferiu-se 200 µL do sobrenadante para um novo microtubo.

Após esse processo, foi adicionado 100 µL de fenol clorofórmio-álcool-isoamílico na proporção de 25:24:1 (centrifugado a 12000 x g por 5 min e novamente passado 150 µL do sobrenadante para um novo microtubo). Acrescentou-se 26,5 µL de acetato de sódio (2 M) e 400 µL de etanol absoluto estocar a -20 °C por 18 horas. Finalmente centrifugou-se a 12.000 x g por 20 min e suspendeu-se o *pellet* com 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Após incubação a 56°C por 15 minutos, o DNA purificado foi estocado a -20°C até o momento da PCR.

As quantidades de DNA obtida nas extrações foram quantificadas por espectrofotometria (L-Quanti, Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Para PCR, as amostras foram diluídas em água ultra-pura estéril até a concentração de 0,7 ug/uL de DNA.

Identificação dos genes *stx1* e *eaeA*

Para a genotipagem das amostras positivas para os genes das toxinas Shiga e Intimina, foram utilizados os seguintes

primers: gene stx1 (GI: 356892774) stx1-F 5'GATTTATCTGCATCCCCGTACG3' e stx1R 5'CTTACGCTTCAGGCACATACAG3'; gene eaeA: eaeAF 5'GACCCGGCACAAGCATAAGC3' e eae AR5'CCACCTGCAGCAACAAGAGG3' (PATON & PATON, 2002). Para as reações foram utilizados 13,85µL de H₂O, 2,5µL de PCR Buffer (20 mM de Tris HCL pH 8,4 e 50mM de KCL), 1,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPmix, 0,5 µM de primers sense e antisense STX1, 0,5 µM de primers sense e antisense *E. coli*, 1 U Taq DNA polimerase, 0,7ug de DNA. As PCR's foram realizadas em termociclador TC-512 (Techne® Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK) com um volume final de 20 µL. As condições da reação da PCR foram: desnaturaçã a 95 °C por 30 segundos, anelamento por 60 °C por 30 segundos e extensã a 72 °C por 30 segundos, durante 36 ciclos. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose na concentraçã de 1%, corado

com Brometo de Etídio. Como controle positivo, utilizou-se DNA bacteriano isolado da cepa de *E. coli* O157:H7 Edl 933, gentilmente fornecida pela Prof^a. Dr^a. Caroline Pigatto De Nardi, do Instituto Federal de São Paulo.

Para verificaçã da sensibilidade das reações de PCR, foram testadas curvas de concentraçã de DNA molde nas seguintes quantidades: 0,1; 1; 10; 100 e 500 ng. Para tanto, utilizou-se o DNA do controle positivo.

Resultados e Disussã

Das 272 amostras de carcaças suínas coletadas por swab de superfície e analisadas para presença de *E. coli*, 25 (9,19%) foram positivas.

A incidência de *E. coli* se manifestou com 20 (16,67%) presenças para as amostras do RS, 5 (6,58%) presenças para as amostras do PR, não ocorrendo contaminaçã das amostras coletadas nas carcaças suínas de SC.

As coletas realizadas em quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga,

paleta e papada) demonstraram resultados diferenciados na identificação da *E. coli*, sendo que a maior incidência ocorreu na papada com 9 (36%) presenças, seguida pelos pontos de pernil e paleta ambos com 6 (24%) presenças e por último a barriga com 4 (16%) presenças para a bactéria pesquisada.

Para verificar se as amostras positivas para *E. coli* possuíam os genes *stx1* e *eaeA*, o DNA da amostra foi testado por PCR. Para definir a sensibilidade das reações, foram testadas diferentes concentrações de DNA, observando-se que para ambas a quantidades acima de 1 ng de DNA produz amplificação suficiente para detecção em gel de agarose (Figura 1).

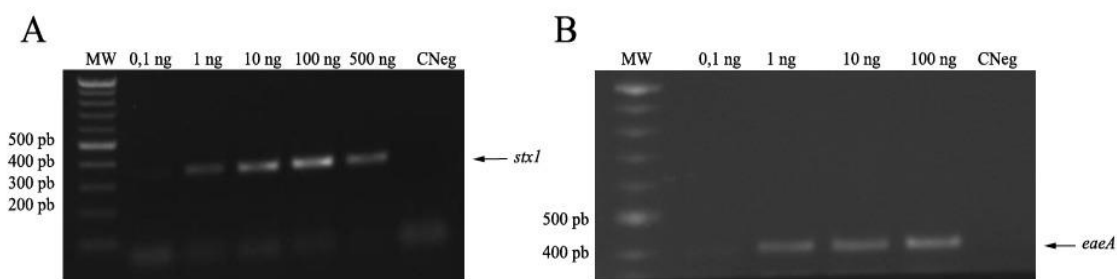


Figura 1 - Curva de concentração de DNA na PCR para amplificação dos genes *stx1* (A) e *eaeA* (B). A seta indica o amplicon relativo ao gene, gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

A genotipagem das culturas positivas para *E. coli* não identificou amostras positivas para o gene *stx1*, contudo 13 amostras foram positivas para gene *eaeA* (Figura 2). Com relação as diferentes regiões da carcaça, observou-se a seguinte distribuição de contaminação: papada: cinco; paleta: quatro; pernil: três e

barriga: uma. A ausência de carcaças suínas portadoras de STEC demonstrado neste estudo está de acordo a baixa incidência relatada em outros estudos. LEUNG et al. (2001) relataram a presença de STEC em 2,1% dos suínos abatidos em Hong Kong. PORTO et al. (2008) observaram a ausência de STEC em

amostras fecais de granjas de suínos na Espanha, BONARDI et al. (2003) e Heuvelink et al. (1999) detectaram a ocorrência de STEC em 0,7% dos suínos abatidos em matadouros ambos da Itália e

Holanda. No Brasil, MARTINS et al. (2011), observou a prevalência de 1,35% de STEC em carcaças no Mato Grosso, o que concorda com a baixa incidência da toxina em suínos observada na literatura.



Figura 2 – Amostras positivas e negativas para PCR do gene *eaeA* em cultura de *E. coli* de swab de carcaça suína. A seta indica o amplicon relativo ao gene. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

O presente estudo demonstra a viabilidade técnica da PCR na para STEC, salienta-se que *E. coli* produtoras da toxina intimina é frequente em alguns abatedouros, recomendando-se, assim, um maior cuidado com relação ao controle de contaminação das carcaças e cortes suínos durante a linha de abate.

Conclusão

Deste forma, os dados encontrados demonstram a ausência de STEC na carcaça de suínos abatidos em abatedouros dos estados do RS, SC e PR.

genotipagem de isolados de *E. coli*. Apesar da não ocorrência de amostras positivas

Contudo, a presença de bactérias produtoras de intimina reforça a necessidade de um maior controle da contaminação das carcaças durante o abate de suínos.

Referências bibliográficas

BOUVET J., BAVAI C., ROSSEL R., LE ROUX A., MONTET M.P., RAYGUENIOT S., MAZUY C., ATRACHE V., VERNOSY-ROZAND C. Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli*

O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, 77: 91-97, 2002.

BOUVET J., MONTET M.P., ROSSEL R., LE ROUX A., BAVAI C., RAYGUENIOT S., MAZUY C., ATRACHE V., VERNIZY-ROZAND C. Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, 77: 99-108, 2002.

BONARDI S., BRINDANI F., PIZZIN, G., LUCIDI L., D'INCAU M., LIEBANA E., MORABITO, S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, 85: 101-110, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pequária e Abastecimento – MAPA, Secretaria da Defesa Agropecuária – SIPOA, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, Coordenação Geral de Programas Especiais – CGPE, Circular 130/2007. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 20 dez 2013.

BRIAN, M. J.; FROSLONO, M.; MURRAY, B. E.; MIRANDA, A.; LOPEZ, E. L.; GOMEZ, H. F.; CLEARLY, T. G. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1, p.1801-1806, 1992.

BROTAM, M.; GIANELLA, R. A.; ALM, P. F.; BAUMAN, H.; BENNETT, A. R.; BLACK, R. E.; BRUHN, C. M.; COHEN, M. B.; GORBACH, S. L.; KAPER, J. B.; ROBERTS, M. R.; STANECK, J. L.; TAYLOR, S.; TROUTT, H. F.; BELL, B. P.; BUCHANAM, R. L.; DURHAM, K.; FENG, P.; FOREMAN, C. T.; GALLER, R. G.; GRAVANI, R. B.; HALL, R. H.; HANCOCK, D. D.; HOLLINGSWORTH, J. Consensus Conference Statement. *Escherichia coli* O157:H7 infections-an emerging national health crisis, July 11-13, 1994. **Gastroenterology**, Duluth, n. 108, p. 1923-1934, 1995.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli*

Strains. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 38-47.

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

DE GRACIA, A. S. **Detecção de DNA de Brucella abortus em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 1997.

FAIRBROTHER, J.M. and NADEAEU, É. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. **Rev Science Technology**, 25: 555-569, 2006.

GERMANO, P.M. L; GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 2^a ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 655 p.v.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1085-1089, 2002.

GYLES C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal Animal Science**, 85: E45-E62, 2007.

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

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, New York, v. 19, n. 1, p. 619-20, Mar. 1983.

KENSCH, G. T.; ACHECON, D. W. K. Patógenos bacterianos entéricos invasivos e causadores de dano tecidual: diarreia sanguinolenta e disenteria. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia de Doenças Infecciosas**. Rio

de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.161-171.

LEUNG P.H.M., YAM W.C., NG W.W.S., PEIRIS J.S.M. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. **Epidemiol Infect**, 126: 173-179, 2001.

LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; DE ROSA, M. F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in South América. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 30-37.

MANNING, S. D.; MADERA, R. T.; SCHENEIDER, W.; DIETRICH, S. E.; KHALIFE, W.; BROWN, W.; WHITTAM, T. S.; SOMSEL, P.; RUDRIK, J. T. Surveillance for Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Michigan, 2001-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n .2, 2007, disponível em <http://www.cdc.gov/EID/content/13/2/318.htm>> Acesso em: 3 de jan. de 2014.

MARGALL, N.; DOMÍNGUEZ, A.; PRATS, G.; SALLERAS, L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Revista Espanola de Salud Pública, Madrid, v.71, n.5, p.437-443, 1997.

MARTINS, R. P., SILVA, M. C., DUTRA, V., NAKAZATO, L., LEITE, D. S., Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil **J. Infect Dev Ctries**; 5(2):123-126, 2011.

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Review: Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.5, n.6, p.179-185, 1998.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; NAKAYAMA, T.; EJIMA, Y.; HIROE, K.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; USAMI, S.; YONEKAWA, M.; SADAMOTO, K.; TAKAYA, S.; SAKAI, N. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM, 1998. p. 73-81.

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

PORTO B., ESTEBAN J.I., ADURIZ G., JUSTE R.A., HURTADO A. *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain. *Zoonoses Public Health*, 55: 73-81, 2008.

PARK, S.; WAROBO, R. W.; DURST, R. A. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1999.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, Jul. 1998.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, p. 271-274, 2002.

PINTO, A. T.; BERGMAN, G. P. Investigação de Enfermidades Transmitidas por Alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, V.14 nº 74, pg 21-25, out. 2000.

SPIKA, J. S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P.; MILLEY, D.; WILSON, J.; WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canadá. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 23-29.

SVS/MS – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. Disponível em: www.portalsaude.gov.br. Acesso em: 19 dez 2013.

TONI, F. de; SOUZA, E.M. de; KLASSEN, G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, C. R. da; PICHETH, G.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Detecção de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 73- 77, 2004.

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

3M™ Microbiologia, 3M do Brasil, Petrifilm™™, Guia de Interpretação, Brasil 2009. Disponível em: <http://www.multimedia.3m.com>. Acesso em: 16 jan. 2013.

WILLSHAW, G. A.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; THOMAS, A.; ROWE, B. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxinproducing strain of *E. coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 897-902, 1994.