

Arina Lopes de Lima

PREVALÊNCIA DE *E. COLI* O157:H7 E LINHAGENS PRODUTORAS DE TOXINA  
DO TIPO *SHIGA* EM CARCAÇAS DE FRANGO DE CORTE ABATIDAS NO  
ESTADO DE MINAS GERAIS

Dissertação apresentada à Escola  
de Veterinária da Universidade Federal  
de Minas Gerais - UFMG, como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Tecnologia e  
Inspeção de Produtos de Origem  
Animal.  
Orientadora: Silvana de Vasconcelos  
Cançado.

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2012

L732p Lima, Arina Lopes de, 1980-  
Prevalência de *E.coli* O157:H7 e linhagens produtoras de toxina do tipo *Shiga*  
em carcaças de frango de corte abatidas no Estado de Minas Gerais/ Arina Lopes de  
Lima- 2012  
49 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de  
Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Frango de corte – Carcaças – Teses. 2. *Escherichia coli* – Teses. 3. Reação em  
cadeia de polimerase – Teses. I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II.  
Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508





### **Agradecimentos:**

À Deus e a toda espiritualidade amiga que estão sempre me acompanhando.

Aos meus pais, Lauro e Conceição, em especial à minha mãe, por todas as oportunidades que proporcionaram para o meu crescimento.

Ao meu marido Leonardo, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando e principalmente me compreendendo.

Aos meus familiares, especialmente minha irmã Ariane, meus filhos Vitor e Lucas, minha sogra Marlene pela ajuda, paciência e compreensão.

À minha excelente orientadora, professora Silvana pela oportunidade de trabalharmos juntas, carinho e atenção.

À Liliane pelo incentivo e apoio me dado durante os momentos mais difíceis.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), pela oportunidade de aprendizado e de desenvolvimento do meu trabalho em suas instalações.

Aos demais colegas do Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos (LSMA) do IMA e da pós graduação pela oportunidade de convivência.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, principalmente Professor Marcelo e Professora Lilian, pelas sugestões e orientações.

À empresa BioControl pela fornecimento do equipamento Assurance GDS.



---

## SUMÁRIO

---

Resumo	13
Abstract	14
1 Introdução	15
2 Revisão Literatura	16
2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos	16
2.2 Ocorrência de Surtos de DTA	17
2.3 Carne de frango	18
2.4 Grupo dos coliformes	18
2.5 <i>Escherichia coli</i>	19
2.6 <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina do tipo <i>shiga</i> (STEC)	20
2.7 Mecanismos de virulência e patogênese	21
2.8 Fontes de contaminação	23
2.9 Doenças humanas causadas pela STEC	27
2.10 Principais reservatórios de STEC	27
2.11 Métodos de diagnóstico de <i>E.coli</i> O157:H7	28
2.11.1 Ensaio de citotoxicidade em cultivo celular	29
2.11.2 Inoculação em ágar específico	29
2.11.3 Ensaio imunológicos	30
2.11.4 Métodos moleculares	31
2.12 Programas de Controle de Qualidade	33
3 Material e Métodos	34
3.1 Amostras	34
3.2 Pesquisa de <i>E.coli</i>	36
3.3 Pesquisa de <i>E.coli</i> O157:H7	36
3.3.1 Preparo das amostras	36

---

---

3.3.2 Preparo da enzima DNA polimerase	37
3.3.3 Metodologia de análise de PCR	37
3.4 Delineamento experimental	39
4 Resultado e Discussão	39
5 Conclusão	42
6 Referências Bibliográficas	42

---



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

APPCC	Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CH	Colite hemorrágica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difuso aderente
DTA	Doenças Transmitidas Por Alimentos
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EspF	Proteína F secretada pela <i>E.coli</i>
EspG	Proteína G secretada pela <i>E.coli</i>
EspH	Proteína H secretada pela <i>E.coli</i>
EspZ	Proteína Z secretada pela <i>E.coli</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GB3	Globotriacilceramida
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
LEE	Ilha de patogenicidade denominada “ <i>locus of enterocyte effacement</i> ”.
LSMA	Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MNEC	<i>E.coli</i> associada a meningite
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
PCR	Reação da cadeia da polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional

---

---

PTT	Púrpura trombocitopênica trombótica
S.I.F.	Serviço de Inspeção Federal
STEC	<i>E.coli</i> produtora de toxina do tipo shiga
<i>Stx</i>	Toxina do tipo <i>shiga</i>
SHU	Síndrome Urêmica Hemolítica
TIR	Proteína associada à mitocôndrias
UPEC	<i>E.coli</i> uropatogênica
VE-DTA	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos
VT	Verotoxina
WHO	Organização Mundial da Saúde
WTO	Organização Mundial do Comércio

---

---

**LISTA DE QUADROS / TABELA**

---

Quadro 1	Características bioquímicas da <i>E.coli</i>	19
Quadro 2	Meios de enriquecimento usados para isolamento de STEC	29
Quadro 3	Métodos imunológicos comercializados e validados para detecção e isolamento de <i>E.coli</i> O157:H7 em alimentos	30
Quadro 4	“Primers” utilizados para detecção de <i>E.coli</i> O157:H7 e toxina do tipo <i>shiga</i> através de PCR RT.	32
Quadro 5	Distribuição da contaminação por coliformes termotolerantes por mesorregião e tipo de fiscalização	39
Tabela 1	Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião e por sistema de fiscalização	36

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Mesorregiões de acordo com IBGE	35
Figura 2	Bloco de preparo da amostra- 20µL do reagente de concentração	37
Figura 3	Bloco de preparo da amostra- 1,0mL da amostra incubada	37
Figura 4	Equipamento Assurance GDS Vortex™	37
Figura 5	Bloco de ressuspensão da amostra- 35µL do tampão de ressuspensão µL	38
Figura 6	Uso da PickPen®	38
Figura 7	Bloco de alumínio com os microtubos	38
Figura 8	Microtubos- 10µL da polimerase	38
Figura 9	Microtubos- 20µL da amostra da placa de ressuspensão	39
Figura 10	Homogeneizando conteúdo dos microtubos	39
Figura 11	Equipamento Assurance GDS Rotor-Gené™	39

---

---

## RESUMO

---

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são consideradas um grande problema de saúde pública mundial. Dentre os micro-organismos que podem ser veiculados pelos alimentos destaca-se o sorogrupo das *Escherichia coli* produtoras de toxina do tipo *shiga* (STEC), onde o principal sorotipo é o O157:H7. Entre diversos produtos onde já se isolaram esse micro-organismo os produtos cárneos são os mais envolvidos. Apesar de os frangos não serem portadores desse patógeno, sua presença já foi observada em carne de frango e seus derivados. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência da *E.coli* O157:H7 e de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga* em carcaças de frango de corte abatidas em estabelecimentos localizados em Minas Gerais. Foram analisadas pela técnica de PCR em tempo real, 180 carcaças de frango de corte coletadas pelos serviços inspeção federal e estadual, no período de setembro de 2010 a maio de 2011. Em estudo preliminar foi isolado coliformes termotolerantes em 90% das amostras, sendo que 35% delas estavam fora do padrão estabelecido pela legislação. Apesar disso, nenhuma amostras estava contaminada pela *E.coli* O157:H7, portanto não foi realizada a pesquisa de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga*. Desta forma, concluiu-se que as carcaças de frango abatidas no estado de Minas Gerais não representam risco para saúde pública com relação à presença de *E.coli* O157:H7 e de cepas produtoras de toxina do tipo *shiga*. Não existindo diferença entre os estabelecimentos sob inspeção federal e estadual quanto a contaminação por *E.coli* O157:H7

Palavras- chave: carcaça de frango; *E.coli* O157:H7; toxina do tipo *shiga*; PCR em tempo real.

---

## ABSTRACT

---

Foodborne Diseases (FBD) are worldwide considered as a public health problem. Among the microorganisms that can be transmitted by foods, *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) is of great concern, mainly O157:H7 serotype. This bacterium has been isolated especially from meat products. Although chickens are not carriers of this pathogen, it has been found in chicken meat and its byproducts. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *E. coli* O157:H7 and *Shiga toxin-producing E. coli* strains in broiler carcasses collected from September 2010 to May 2011 at federal and state inspected slaughterhouses located in Minas Gerais - Brazil. A total 180 broiler carcasses were analyzed by real-time PCR. In a preliminary study, fecal coliforms were isolated in 90% of the samples, of which 35% were in higher numbers than the standard established by legislation. Nevertheless, no samples were contaminated by *E. coli* O157:H7. Thus, it was concluded that the broiler carcasses analyzed in the state of Minas Gerais did not pose a risk to public health in relation to the presence of *E. coli* O157: H7 and *Shiga toxin-producing E. coli* strains. Also, no difference was observed between the establishments under federal or state inspection regarding the contamination by *E. coli* O157: H7.

Keywords: chicken carcasses, *E. coli* O157:H7, *Shiga-like* toxin, real-time PCR

## 1- INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos EUA e da China. Em 2010 a produção brasileira foi de 12,23 milhões de toneladas, 11,38% a mais que no ano de 2009. Esse crescimento foi impulsionado pelo aumento do consumo de carne de frango e pela expansão nas exportações. O Brasil exportou 3,81 milhões de toneladas de carne de frango, ocupando o primeiro lugar mundial nesse quesito, o que representa 31% do volume total produzidos. Os 69% restantes foram destinados ao mercado interno onde o consumo per capita foi de 44 quilogramas (UBA, 2011).

A carne de frango é uma excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e de minerais. Porém, devido suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade é um ótimo meio para desenvolvimento de micro-organismos. Portanto, cuidados durante seu processamento são de extrema importância para que não ocorram surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA).

As DTA são conhecidas desde épocas muito remotas e cerca de 250 agentes biológicos já foram identificados. Esses agentes podem causar diversas doenças que se manifestam de forma isolada ou associada, tais como as diarreicas, neurológicas, renais, hemolíticas, ictéricas, alérgicas, respiratórias e sistêmicas. A diarreia é a manifestação clínica mais comum das DTA, devido sua elevada incidência ou por ser considerado ainda um fato “normal”, tanto por parte da população como dos

profissionais de saúde representa um desafio para o seu registro e controle. Assim, a subnotificação das DTA tem sido o fator principal a impedir o conhecimento do seu verdadeiro impacto na população, dificultando, conseqüentemente, o conhecimento dos alimentos e micro-organismos envolvidos (CVE/SES-SP,2002).

A bactéria *Escherichia coli* é um micro-organismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que faz parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de uma variedade de animais domésticos. Apesar de fazer disto, em 1982 e 1993, nos Estados Unidos, ocorreram surtos de DTA causados por *E. coli*, originados pelo consumo de carne (Jay, 2005). A partir de então, *E. coli* passou a ser estudada e diagnosticada com maior frequência. Foram catalogadas linhagens de *E. coli* responsáveis por hemorragias intestinais graves. Estas linhagens de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) são implicadas em casos de doenças veiculadas por alimentos, e produzem toxina do tipo *shiga* (stx1 e stx2). Dessas linhagens, o sorotipo de maior importância é o *E.coli* O157: H7, que está associado com quadros de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (Sigarini, 2004; Bertão & Saridakis, 2007; Pigatto, 2008).

A bactéria *E.coli* é um importante patógeno na avicultura moderna, pois provoca grandes perdas econômicas na produção de frangos e perus em todo o mundo. Apesar da maioria dos sorotipos serem patogênicos somente para as aves e não serem causadores de infecções em mamíferos, incluindo o

homem, *E.coli* O157:H7 já foi isolada de carcaças de frango de corte.

Com base nestes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a existência e prevalência de *E.coli* O157:H7 em carcaças de frangos produzidas em indústrias frigoríficas do Estado de Minas Gerais. E também avaliar a prevalência de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga* dentre as linhagens de *E.coli* O157:H7 encontradas nestas carcaças.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Doenças Transmitidas por Alimentos

Atualmente o alimento tem sido considerado a principal fonte de veiculação de doenças e diversos fatores tem contribuído para isso como por exemplo: o desenvolvimento econômico e a globalização do mercado mundial; as modificações no estilo de vida da população com a crescente utilização de alimentos industrializados e a mudança de hábitos do consumidor; os processos tecnológicos de produção que podem propiciar condições para o surgimento de novos patógenos com o uso indiscriminado de antimicrobianos na criação de animais; o uso de rações industrializadas; os processos industriais de preparação do alimento; o aumento do consumo de alimentos “*in natura*” ou crus (CVE/SES-SP 2002).

As DTA podem ser causadas por ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. Normalmente essas doenças levam ao quadro de anorexia, náuseas, vômitos

e/ou diarreia e, dependendo do agente etiológico, quadros mais severos podem ocorrer. Como causadores de DTA já foram identificadas as bactérias *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 e outros sorogrupos de *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e vibrios; os parasitas *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia* e *Toxoplasma gondii* e os vírus Rotavírus, Adenovírus, Calicivírus, Astrovírus, Coronavírus, Norwalk e Norwalk-like (CVE/SES-SP 2002).

As DTA podem se manifestar através de infecções, intoxicações e toxinfecções alimentares. As infecções alimentares ocorrem após ingestão de alimentos contendo micro-organismos patogênicos vivos, como no caso das salmoneloses. As intoxicações alimentares ocorrem quando o alimento ingerido está contaminado com a toxina pré formada não sendo necessário que o agente produtor esteja viável, como por exemplo, a toxina produzida pelo *Staphylococcus aureus*. As toxinfecções ocorrem quando o alimento ingerido apresenta o micro-organismo patogênico que, dependendo da sua quantidade, são capazes de produzir toxina, como por exemplo, algumas linhagens de *Escherichia coli* produtoras de toxinas (SVS/MS, 2005).

Apesar da comprovada relação de várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados, do elevado número de internações hospitalares e da persistência de altos índices de mortalidade infantil por diarreia em alguns estados e municípios do Brasil pouco se conhece da real magnitude do problema, pois os casos e surtos de



DTA são pouco ou não são notificados no país (SVS/MS, 2005).

## 2.2- Ocorrências de surtos de DTA

Segundo a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), um surto de DTA é o episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após ingerirem alimento ou água da mesma origem e que a evidência epidemiológica ou a análise laboratorial apontam para esses como veículos da doença (SVS/MS, 2005).

Nos EUA em 2008 foram relatados 1.034 surtos de DTA, que resultaram em 23.152 casos de doença com 1.276 hospitalizações e 22 mortes. Dos 1.034 surtos notificados, em somente 218 foi possível identificar um único alimento envolvido, sendo a carne de frango responsável por 15%. Já o agente etiológico foi identificado em 479 surtos, onde 8% deles foram causados pela *E.coli* produtora de toxina do tipo *shiga* (STEC) e dentro desse sorogrupo o sorotipo O157 representou 97%. Com relação aos agentes causadores das hospitalizações a STEC foi responsável por 17% dos casos. Entre os 22 óbitos, dois foram causados pela *E.coli* O157(CDC, 2011).

No Brasil, desde a criação e implantação do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) em 1999, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) registrou até agosto de 2008, 6.062 surtos de DTA, com acometimento de 117.330 pessoas e 64 óbitos. As regiões Sul e Sudeste notificaram 82,7% destes surtos, e os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina foram os

que apresentaram os maiores registros, o que pode estar relacionado com a melhor implantação do sistema de VE-DTA em seus municípios. Apesar de as notificações terem ocorrido, algumas informações não foram obtidas, como agente etiológico (51%), alimento veiculador (34,3%) e o local de ocorrência (24,1%). Entre os surtos em que o agente etiológico foi identificado (2.974 surtos), 84% foram causados por bactérias, 13,6% por vírus, 1% por parasitas e 1,2% por produtos químicos. O micro-organismo mais envolvido com os surtos notificados foi a *Salmonella* spp. (42,9%), seguida pelo *Staphylococcus* sp. (20,2%). Com relação aos alimentos, os que continham ovos crus ou mal cozidos (22,8%) foram os mais envolvidos, seguido de produtos mistos (16,8%) e em terceiro lugar as carnes vermelhas (11,7%). O local de ocorrência mais relatado foram as residências (45,2%) seguidas dos restaurantes (19,7%) (SVS/MS, 2008).

De acordo com a SVS (2011) durante o período de 2000 a 2011, ocorreram 7.234 surtos de DTA. Somente em 3.487 surtos foi possível identificar o alimento envolvido, onde a carne de frango, processados e miúdos foram responsáveis por 225 surtos representando 3,11%.

Os produtos de origem animal em geral, e em particular os de origem avícola, têm recebido por parte do consumidor uma grande dose de atenção e preocupação isto devido à carne de ave está frequentemente implicada como veículo de transmissão de surtos de doenças alimentares (Delazari, 1998; Cardoso & Araujo; 2001).

### 2.3- Carne de frango

A carne e os derivados do frango são alimentos cada vez mais presentes na mesa dos consumidores no mundo inteiro, em virtude do seu preço altamente competitivo. Apresenta boa digestibilidade, além de ser uma boa fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e minerais, como ferro e zinco (Almeida Filho et al, 2003).

Essa composição rica em nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, faz com que a carne seja muito perecível, podendo deteriorar-se em um breve espaço de tempo. O tipo e o número de micro-organismo presentes na carne refletem o grau de sanitização do abatedouro, como também das condições de armazenamento após o abate dos animais, o que naturalmente define sua qualidade (Silva et al, 2001).

Apesar de todos os avanços tecnológicos verificados nos últimos anos, esse produto pode ser contaminado por diversos micro-organismos. Essa contaminação pode ser pela microbiota oriunda das aves vivas ou devido à incorporação de bactérias presentes em qualquer uma das fases do abate, do processamento e/ou do armazenamento. São consideradas possíveis fontes de contaminação a água, o ar, os manipuladores, o gelo, havendo portanto uma tendência ao aumento da contaminação à medida que a ave progride na cadeia do abate (Cotta e Delpech, 2000).

Na carcaça de aves podem ser isoladas bactérias mesófilas causadoras de DTA como *Salmonella* sp, *Campylobacter* sp,

*Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Silva et al, 2001).

### 2.4- Grupo dos Coliformes

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* que inclui 44 gêneros e 176 espécies. Nesse grupo estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em um período de 24 horas a 48 horas à 35°C. Quatro gêneros da família *Enterobacteriaceae* representam estes grupos: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (Jay, 2005).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas à 44,5 a 45,5°, com produção de gás. Sendo o gênero *Escherichia* o melhor indicador de contaminação fecal (Jay, 2005).

A pesquisa de coliformes fecais ou de *E.coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos. (Franco & Landgraf, 2008).

A resolução RDC nº12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano, e de acordo com essa legislação o limite máximo permitido para coliformes termotolerantes é de 10<sup>4</sup> unidade formadora de colônia (UFC) / grama.

A qualidade microbiológica de carnes e derivados é altamente influenciada pelas condições higiênicas durante sua produção e manipulação. Sem um controle higiênico adequado, o ambiente de abatedouros e açougues pode representar um importante ponto de contaminação (Barros et al., 2007).

De acordo com Barros et al., 2007 nos açougues os principais pontos de contaminação, em ordem decrescente, são caixas de aço inoxidável, amaciadores de carne, moedores, facas, misturadores, embutadeiras, caixas plásticas, piso e ralos. Já no abatedouro, os principais pontos são embutadeiras, superfícies de plataforma de abate, piso e ralos.

## 2.5- *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita em 1885 como uma bactéria

Quadro 1 : Características bioquímicas da *E.coli*

Testes bioquímicos positivos	Testes bioquímicos negativos
Indol	Gram
Motilidade	Oxidase
Formação de gás	Voges-Proskauer
Utilização de acetato	Citrato
Produção de catalase	-
Fermentação de sorbitol	-
Aividade $\beta$ -glucoranidase	-

Fonte: Adaptado de Manual Bergey's, 2005.

A bactéria *Escherichia coli* normalmente coloniza o trato gastrointestinal de crianças dentro de poucas horas após o nascimento. Essas linhagens comensais raramente causam doenças em hospedeiros saudáveis. No entanto, clones de *E. coli* adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem a estas bactérias maior capacidade de se adaptar a novos nichos

componente da microbiota intestinal por T. Escherich, que a denominou *Bacterium coli commune*. Escherich mostrou naquela época que esse micro-organismo era patogênico quando injetado em coelhos. Em 1945, Bray associou essa bactéria à diarreia infantil e a denominou por *Bacterium coli neapolitanum* (Bertão e Saridakis, 2007).

A *E.coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, definida como bastonetes Gram negativos, anaeróbio facultativo, não formador de esporos. Podem ser imóveis ou possuírem motilidade através de flagelos (Brenner et al., 2005). As principais características bioquímicas da *Escherichia coli* estão descritas no quadro 1:

e dessa maneira causar um amplo espectro de doenças, dentre elas as diarreicas, as infecções do trato urinário e as meningites. Dentre as linhagens de *E.coli* intestinais, causadoras de doenças diarreicas existem seis categorias bem descritas: a enteropatogênica (EPEC), a enterotoxigênica (ETEC), a enteroinvasiva (EIEC), a enteroagregativa (EAEC), a difuso

aderente (DAEC) e produtora de toxina do tipo *shiga* (STEC). Os patótipos de *E.coli* implicados em doenças extraintestinais são conhecidos como ExPEC, sendo exemplos deles, *E.coli* uropatogênica (UPEC) e *E.coli* associado à meningite (MNEC). Linhagens pertencentes a cada uma destas categorias utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, consequência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade, além da presença de bacteriófagos (Paton e Paton, 1998; Hacker et al., 1999).

## 2.6- *Escherichia coli* produtoras de toxina do tipo *shiga* (STEC)

As linhagens de *E.coli* capazes de produzir no mínimo um membro da classe das potentes citotoxinas chamadas de toxina do tipo *shiga* são conhecidas como STEC. Esse grupo também é conhecido como *E.coli* produtoras de verotoxinas (VT). O nome toxina do tipo *shiga* (Stx) é devido à familiaridade com as citotoxinas produzidas pela *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 e verotoxina (VT) baseado na citotoxicidade para as células Vero (Konowalchuck et al., 1977, O'Brien et al., 1982) O grupo de STEC que causa colite hemorrágica (CH) e síndrome urêmica hemolítica (SHU) é chamado de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) (Levine et al., 1987).

Estudos utilizando biologia molecular sugerem que a STEC (O157:H7) evoluiu de linhagens de EPEC que adquiriram genes para a produção de toxina do tipo *shiga*. Esse processo

provavelmente ocorreu quando ao infectar uma *Shigella* spp., o fago adquiriu esse gene e depois o transferiu para EPEC, resultando em mais um micro-organismo virulento (Besser et al., 1999).

O principal sorotipo das STEC é *E.coli* O157:H7, que é assim denominado por ter o 157º antígeno somático (O) identificado como o 7º antígeno flagelar (H). A *E.coli* O157:H7 foi primeiramente identificada como patógeno em 1983 nos EUA, devido à diarreia sanguinolenta que afetou 47 pessoas que consumiram hambúrgueres contaminados. Desde então, passou a ser considerado um patógeno entérico de importância em saúde pública (Bertão e Saridakis, 2007; Teixeira, 2008).

STEC não O157, incluindo O26, O103, O111, O113 e O121 são também associados à doenças. O sorogrupo O26 foi o mais frequente nas infecções por STEC não O157 nos EUA. Entre 1983 e 2002, os sorotipos O26 e O111 foram reportados como causa emergente de doenças na Coreia (Lee et al., 2009). Na Alemanha o sorotipo O103 foi o mais isolado entre os casos reportados ao Instituto Robert Koch (Robert, 2005)

A maioria das linhagens de *E.coli* O157:H7 diferem das demais pela sua inabilidade de fermentar o sorbitol e pela não produção de β- glucuronidase. Apesar disso, algumas linhagens de *E.coli* O157:H7 capazes de fermentar sorbitol já foram associadas à CH e SHU na Alemanha, sendo raras essas linhagens nos EUA (Besser et al., 1999).

## 2.7. Mecanismos de virulência e patogênese

Os fatores de virulência da *E.coli* O157:H7 incluem adesinas fimbriais e não fimbriais, flagelo, toxinas, o aparato de secreção tipo III e a hemolisina (Gyles, 2007). A Intimina, o *toxB* codificado por plasmídeo, o *locus* genético cromossomial *efa* 1 e as adesinas codificadas por cromossomos: (Ilha e OmpA) são exemplos de adesinas fimbriais. A intimina desempenha papel importante na adesão da bactéria à célula hospedeira. O *toxB* promove a produção e secreção das proteínas tipo III. *Efa* 1 é o fator responsável pela aderência de algumas linhagens de *E.coli* as células epiteliais, associada, portanto a colonização do epitélio de bovinos. A OmpA é a proteína A da membrana externa e está relacionada com a aderência da *E.coli* as células HeLa (células tumorais do colo uterino) e Caco2 (células tumorais do intestino) (McKee et al., 1995; Tatsuno et al., 2001; Johnson et al., 2005; Torres et al., 2005; Gyles, 2007).

A produção de intimina está relacionada com a presença do gene *eae* usado como marcador da ilha de patogenicidade denominada “*locus of enterocyte effacement*” (LEE). As linhagens de *E.coli* que apresentam esse gene (*eae* positiva) causam uma lesão característica chamada de “attaching and effacing” (AE) nas células epiteliais intestinais (Nataro e Kaper, 1998; Kaper, 2004).

A LEE é organizada em 05 maiores operons policistrônicos (unidades genéticas funcionais constituídas de vários genes estruturais) chamados de LEE1 até LEE5. LEE1 a LEE3 estão

relacionados com o aparato de secreção do tipo III, LEE4 com sistema de secreção de proteínas e LEE5 com o sistema de adesão da intimina e seu receptor, denominado receptor de intimina translocada. O aparato de secreção é uma estrutura molecular, semelhante a uma seringa, que inicia dentro do citoplasma bacteriano, se estende através da membrana interna e externa da bactéria e passa através da célula hospedeira. É através dessa estrutura que as proteínas secretadas (Tir, proteína associada à mitocôndria, Proteína F, G, H e Z secretada pela *E.coli*-EspF, EspG, EspH e EspZ respectivamente) são transferidas da célula bacteriana para a célula hospedeira. Uma série de proteína codificada por non-LEE são também translocadas (Barab, 2005). A proteína TIR translocada se insere na membrana da célula hospedeira e age como receptor de intimina na superfície bacteriana, apesar de certos componentes das células hospedeiras também se ligarem a intimina. A TIR e outras proteínas secretadas ativam um número de sinais em cascatas que resultam no rearranjo da arquitetura das células epiteliais intestinais e na mudança da fisiologia da célula. Esse rearranjo inclui perda da microvilosidade, formação de pedestal e acúmulo de proteína no citoesqueleto, benéfico para a bactéria aderente (Gyles, 2007). Apesar da lesão AE não ser essencial para que ocorra a diarreia com sangue e a SHU em humanos, a maioria das linhagens implicadas com essas síndromes são *eae* positiva (Ethelberg, 2004).

Existem no mínimo 17 tipos de intimina ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2/ $\theta$ ,  $\delta$ / $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\eta$ 2,

ι, λ, μ, ν, ξ, ο) associada com a heterogeneidade da parte C-terminal da molécula que é envolvida na ligação TIR (Blanco, 2004; Krause, 2005). Essas variantes da intimina são atribuídas entre STEC e EPEC de origem humana e animal. A  $\gamma 1$  intimina está associada com sorotipos de STEC altamente patogênicos tais como O157:H7 e O145:H- (Blanco, 2005; Rivas, 2006).

As estruturas fimbriais que já foram identificadas incluem duas fimbrias polares longas (Lpf<sub>O157-O1-141</sub>, Lpf<sub>O157-O1-154</sub>); F9, um homólogo do pilus tipo I; dois pilus tipo IV (HCP nas *E.coli* O157 e TFP nas não O157); as fimbrias codificadas por plasmídeos da *E.coli* O157:H7 fermentadora de sorbitol e os pilus SFP e ECP produzidos tanto por *E.coli* patogênica como não patogênica. A Lpf<sub>O157-O1-141</sub> participa na formação de micro colônias, enquanto que a Lpf<sub>O157-O1-154</sub> participa da aderência (Brunder et al., 2001; Low et al., 2006; Gyles, 2007; Blackburn et al., 2009).

Embora linhagens STEC tenham a capacidade de invadir os enterócitos, a infecção parece ser localizada, sem qualquer evidência de septicemia. Os efeitos sistêmicos são atribuídos primariamente a ação das toxinas absorvidas pelo intestino (Gyles, 2007).

A capacidade de produzir toxina do tipo *shiga* é uma característica de todas as linhagens de STEC. A presença dos genes para a produção de toxinas em bacteriófagos propicia não somente a capacidade de disseminação entre diferentes linhagens, mas também possibilita a presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. Existem dois subgrupos de toxina do tipo *shiga*, stx1

e stx2, os quais podem ser encontrados em diversas combinações nos isolados de STEC. A molécula Stx1 é uma estrutura altamente conservada e é idêntica a *shiga* toxina da *S.dysenteriae* tipo 1. A stx1c, uma variante da Stx1, é mais comumente encontrada em linhagens de origem ovina (Brett, 2003). Existem diversas variantes antigênicas de Stx2, chamadas de Stx2c, Stx2d, Stx2 2d-ativável, Stx2e e Stx2f, que diferem na sua atividade biológica e na associação com doenças (Gyles, 2007).

Todas as moléculas de Stx possuem a subunidade A e a B. Embora possuam o mesmo mecanismo de ação, apenas 55% da sequência de aminoácidos é idêntica entre a subunidade A da Stx1 e da Stx2. A subunidade A possui uma atividade enzimática que permite que a toxina quebre uma base adenina específica no 28rRNA e através disso impeça a síntese protéica (Gyles, 2007).

O receptor das Stx é o globotriacilceramida (GB3), encontrado nas células na mucosa intestinal humana e na superfície das células epiteliais dos rins. A expressão do GB3 é o determinante primário para a susceptibilidade a injúria tissular. A falta desses receptores no trato gastrointestinal dos bovinos pode justificar a colonização por EHEC assintomática nos mesmos (Gyles, 2007).

Existem evidências de uma associação do Stx2 com o alto risco de desenvolver SHU e a presença de ambos os genes *eae* e *stx2* no STEC isolado é considerado preditor de SHU (Boerlin, 1999; Ethelberg, 2004). Stx2 é mil vezes mais tóxica para as células do

endotélio microvascular renal humano do que a Stx1 (Louise et al., 1995).

Os flagelos são responsáveis pela motilidade da bactéria. Com relação à hemolisina não se sabe exatamente qual é o seu papel na patogenicidade, mas acredita-se que seja pela lise dos eritrócitos com liberação de ferro para o crescimento da STEC (Bertão e Saridakis, 2007; Teixeira, 2008).

Vários sorotipos de STEC têm apresentado resistência à acidez, portanto, a acidez gástrica não apresenta um problema para esses sorotipos, apesar da resistência variar consideravelmente de linhagem para linhagem. A exposição a ambientes ligeiramente ácidos induz a uma resposta de tolerância a acidez aumentando a resistência a pH cada vez mais ácidos (Large, 2005).

## 2.8- Fontes de contaminação

Os humanos normalmente se tornam infectados com STEC pela ingestão de alimento e água contaminados ou através do contato direto com os animais. Fontes de contaminação incluem carne, salsicha, leite cru, queijo, suco de maçã não pasteurizado, alface, melão, rabanete e água. A transmissão também pode ocorrer de pessoa para pessoa (Gyles, 2007).

A *E.coli* O157:H7 pode persistir no ambiente da fazenda, água, solo, sedimentos e carcaça de animais. Esse micro-organismo tem demonstrado a capacidade de anexar, colonizar e formar biofilmes em uma variedade de superfícies. O biofilme é uma comunidade de micro-organismos embebidos numa matriz polimérica

produzida por eles mesmos. A fixação de bactérias, colonização e formação de biofilmes em alimentos ou em uma superfície que entre em contato com alimentos, pode servir como fonte para biotransferência ou contaminação cruzada entre produtos (Uhlich et al., 2006).

A capacidade da *E.coli* O157:H7 em formar biofilme pode ser atribuída ao sinal auto-indutor-2 (AI-2), envolvido na regulação dos genes da quimiotaxia, síntese flagelar e motilidade (Pillai and Jesudhasan, 2006). Os auto-indutores são pequenas moléculas produzidas pelas células bacterianas, que atravessam a célula e vai se acumulando no ambiente em quantidade proporcional ao crescimento celular. Por meio do mecanismo de comunicação entre as bactérias (“*quorum sensing*”), a mesma é capaz de detectar a concentração de auto-indutores e dessa maneira perceber o tamanho da população. A partir de uma concentração limite dos auto-indutores, esses sinais servem de co-indutores e passam a regular a transcrição de genes (Rumjanck et al., 2004).

Silagyi et al., (2009) avaliaram o efeito da produção de biofilme e de AI-2 na ligação *E.coli* O157:H7 em superfícies que entram em contato (aço inoxidável e vidro) com os alimentos e avaliaram a transferência desse patógeno dessas superfícies para diferentes tipos de alimentos (carne bovina, carne suína, carne de frango, presunto de peru, melão, alface, broto de alfafa e espinafre). Os pesquisadores observaram que linhagens de *E.coli* O157:H7 podem formar biofilmes em diversos ambientes produtores de

alimentos e que essa produção de biofilme pode não ser diretamente afetada pelo crescimento bacteriano nos caldos dos alimentos testados. Foi observada uma rápida degradação dos sinais AI-2 em carne bovina e carne de frango em 24 horas de incubação, sugerindo que o sinal AI-2 desempenhe um papel importante no estágio inicial de formação de biofilme pela *E.coli* O157:H7 em certos tipos de alimentos. Com relação à formação de biofilme nas superfícies que entram em contato com os alimentos, os autores observaram que de um modo geral essa formação pela *E.coli* O157:H7 ocorre melhor em superfícies de aço inoxidável do que de vidro. Com relação à transferência de *E.coli* O157:H7 presente das superfícies de aço inoxidável e vidro para os produtos, o número de colônias encontradas na superfície de carne de porco crua, carne de frango crua, presunto de peru foram  $4,4\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ ,  $4,4\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ ,  $4,2\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$  e  $4,1\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$  respectivamente, mostrando a ocorrência de transferência.

A presença de *E.coli* O157 em produtos cárneos tem sido relatada por diversos autores. Doyle e Scheni (1987) analisaram 147 amostras de carne moída, 250 de carne suína, e 200 de carne de cordeiro oriundas da seção de carnes refrigeradas de diversos mercados localizados em Madison nos EUA. Adicionalmente coletaram 17 amostras de carne moída, 14 de carne suína, 06 de carne de frango e 05 de carne de cordeiro em mercearias de Calgary e Alberta no Canadá. O micro-organismo foi isolado de 06 (3,7%) amostras de carne moída, 04 (1,5%) de carne suína, 04 (1,5%) de carne de

frango e 04 (2%) de carne de cordeiro, o que de acordo com os autores indica que essa bactéria está associada com produtos de origem animal e não especificamente com carne bovina

No Egito, Abdul-Raouf et al (1996) pesquisaram *E.coli* O157:H7 em amostras de alimento dividida em 04 grupos. Primeiro grupo composto de 50 amostras de carne bovina moída, segundo de 50 amostras de frangos desossados, terceiro grupo de 25 amostras de carne de cordeiro e o quarto grupo de 50 amostras de leite de vaca pasteurizado. Essas amostras foram coletadas de matadouros frigoríficos, supermercados e fazendas. A *E.coli* O157:H7 foi isolado de 03 (6%) das amostras de carne bovina moída, 02 (4%) das amostras de frango desossado, 01 (4%) das amostras de carne de cordeiro, 03 (6%) das amostras de leite pasteurizado.

Tutenel et al., (2003), estimaram a prevalência de *E.coli* O157 em 3.625 amostras de carne fresca coletadas pelo serviço de inspeção, durante o período de 1999 a dezembro de 2001 na Bélgica. Foram coletados “swab” de carcaça bovina (2452), carcaça de vitelo (147), carcaça suína (85) e carcaça de frango (71). Além dessas carcaças, 549 amostras de carne bovina moída e 203 amostras de peito de frango também foram analisadas. Das 3.625 amostras testadas, 451 (12%) foram positiva para *E.coli* O157 usando o sistema Vidas ECO<sup>TM</sup>, mas em somente 27 (0,74%) foi confirmado o isolado linhagem de *E.coli* O157 através do IMS. Das 274 amostras de frango, 96 (35%) foram positivas para *E.coli* O157 usando o sistema Vidas ECO<sup>TM</sup>, não sendo



confirmada nenhuma linhagem pelo IMS, demonstrando para os autores a baixa especificidade do sistema Vidas ECO™ para o isolamento de *E.coli* O157.

Akkaya et al., (2006) na Turquia, isolaram *E.coli* O157:H7 em duas (1,05%) das 190 amostras de carcaça de frango fresco coletadas durante o período de abril a julho de 2004.

Chinen et al., (2009) isolaram linhagens de *E.coli* O157:H7 de hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres de carne de frango após episódios de infecção notificados em 2001 e 2002 em Buenos Aires. As análises foram feitas em 150 amostras de hambúrgueres bovino (89 crus e 61 cozidos) e 129 amostras de hambúrgueres de frango (79 crus e 50 cozidos) coletadas de um total de 33 estabelecimentos. Nesse mesmo período, os autores coletaram também 39 amostras de carcaça de frango crua congelada em 16 pontos de venda, com objetivo de estabelecer o papel do frango como fonte de contaminação por *E.coli* O157:H7. Entre as 279 amostras de hambúrguer pesquisadas, em 19 (6,8%) foram isolados 20 linhagens de *E.coli* O157:H7 e das 39 carcaças de frango, em 04 (10,3%) carcaças foram isoladas 04 linhagens de *E.coli* O157:H7. No ano de 2001 foram isoladas 14 dessas linhagens e o restante em 2002. Dos 33 estabelecimentos em 13 foram isolados linhagens desse micro-organismo. Com relação às carcaças de frango, as amostras positivas foram coletadas em 03 dos 16 pontos de venda.

Na Coréia, Lee et al., (2009) trabalharam com amostras de carne, que incluíam 750 amostras de carne bovina,

900 de carne de frango, e 1.350 de carne suína. O objetivo do trabalho era avaliar a presença de *E.coli* nesses produtos cárneos frescos durante o período de 2004 a 2006 e caracterizar a linhagem isolada quanto ao grupo de virulência e sorotipo. As amostras foram coletadas de plantas de processamento de carne, açougues, lojas de atacado e mercados convencionais. Das 3.000 amostras totais, 273 (9,1%) linhagens de *E.coli* foram isoladas. Os isolados de *E.coli* foram encontrados em 201 (14,9%) das amostras de carne suína, 41 (4,6%) das amostras de carne de frango, 31 (4,1%) das amostras de carne bovina. Foram isoladas 273 linhagens de *E.coli*, com 11 (35,5%) linhagens isoladas de carne bovina, 10 (24,3%) de carne de frango e 18 (9,0%) de carne suína. Esses isolados foram categorizados em três categorias de acordo com seus fatores de virulência: 17 ETEC (43,6%) > 14 EHEC (35,9%) > 8 EPEC (20,5%). Na carne bovina linhagens de EHEC foram mais prevalentes (22,6%), comparadas com ETEC e EPEC com 6,5 %cada. Na carne de frango e na carne suína as linhagens de ETEC foram maiores que EHEC e EPEC. Dos 41 isolados de *E.coli* da carne de frango, 10 micro-organismos foram identificados e classificados como 06 ETEC (14,6%), 03 EHEC (7,3%) e 01 EPEC (2,4%). Na carne suína 18 patógeno de *E.coli* foram isolados e classificados como 09 ETEC (4,5%), 05 EPEC (2,5%) e 04 EHEC (2,0%). Entre as 39 linhagens de *E.coli* isoladas, 14 EHEC foram categorizadas, sendo encontradas 09 positivas para produção de VT2, 02 positivas para VT1/VT2, 02 positivas para VT2/*eaeA* e 01 positiva para VT1/*eaeA*. Com

relação ao sorogrupo nenhuma amostra do sorogrupo O157 foi isolada.

Na Argentina, Alonso et al., (2012) trabalharam com amostras de “swab” cloacal de frangos de corte de diferentes granjas e amostras de hambúrguer de frango, carcaça de frango e miúdos (fígado, coração, moela e pescoço) coletados em açougues e em casas que só comercializam produtos de frango. O objetivo do trabalho foi pesquisar a presença dos genes *eae* e *stx* que codificam respectivamente os fatores de virulência: intimina e produção de toxina do tipo *shiga*, e com os resultados inferir e comparar a contaminação dessas amostras por STEC e EPEC. A amostra foi considerada como contaminada por STEC quando isolado gene *stx*, por EPEC quando isolado gene *eae* e por STEC/EPEC quando isolado os dois genes. Nos açougues foram coletadas 140 amostras de hambúrguer, 106 amostras de miúdos, 160 carcaças. Nas casas que comercializam carne de frango, foram coletadas 160 amostras de hambúrguer, 194 miúdos e 297 carcaças. Foram coletados 2 “swabs” de cada carcaça, um “swab” da superfície externa e outro da cavidade visceral. Foram coletados “swab” cloacal de 559 frangos de três sistemas de criação intensiva de pequena escala e “swab” cloacal de 300 frangos de uma granja comercial. Para pesquisar os genes o PCR multiplex foi utilizado. As amostras que foram positivas para o gene *stx* foram testadas para o gene *eaeY1*, característico do sorogrupo O157. E as amostras positivas para o gene *eae*, foram testadas para o gene *bpfA*<sup>+</sup>. Do total de 1057 amostras de produtos de frango 5% estava contaminada por

STEC, 2,4% por STEC/EPEC e 20% por EPEC. Com relação as amostras de hambúrguer, 21% estavam contaminadas com EPEC, 10,3% com STEC e 7,7% com STEC/EPEC. Nos açougues as amostras de hambúrguer estavam mais contaminadas com STEC, já nas casas que comercializam somente frango foram isolados mais linhagens de EPEC. Para as amostras de miúdos, 43,3% estavam contaminadas com EPEC, 2,3% com STEC e 1% com STEC/EPEC. Sendo que a contaminação por EPEC predominou sobre a STEC nos dois tipos de estabelecimentos. Com relação às carcaças uma proporção baixa de contaminação foi observada tanto para STEC (3,3%) como para EPEC (3,9%), em similar proporção para os dois tipos de comércio. A contaminação por EPEC foi maior na cavidade visceral do que na superfície externa, já a contaminação por STEC foi similar para os dois locais coletados. Das 859 amostras de “swab” cloacal, 102 (11,9%) estavam contaminadas por EPEC, e somente uma (0,1%) estava contaminada por STEC. A distribuição dos genes *stx* entre os tipos de comércio variou significativamente. Nas casas que comercializam somente frango o gene *stx2* predominou sobre ambos *stx1* e *stx1/stx2* para o hambúrguer, miúdos e carcaça. O mesmo foi observado para as amostras de hambúrguer e miúdos do açougue, porém para as carcaças coletadas nos açougues predominou o gene *stx1*. Todas as carcaças positivas para *stx1* foram isoladas em apenas um momento da coleta e na mesma loja, não representando uma tendência. Apesar do isolamento de STEC, nenhuma linhagem de *E.coli* O157:H7

foi isolada já que não detectaram o gene *eaeY1*.

## **2.9- Doenças Humanas causadas pela STEC**

Apesar de quase 500 sorotipos de STEC já terem sido isolado de humanos doentes, a maioria dos casos é causado por linhagens dos sorogrupos O, sendo o sorotipo O157:H7 o mais envolvido. A dose infectante é de apenas 10 bactérias, que não precisam multiplicar-se no alimento, sendo a contaminação original suficiente para causar a doença (Wahlstrom, 2001 citado por Pigatto, 2008). De acordo com o Regulamento do Serviço de Inspeção de Segurança Alimentar dos EUA a presença de uma unidade formadora de colônia de *E.coli* O157:H7 em 25g de um alimento, já é um risco à saúde pública (Johnson et al, 1998).

A infecção por *E.coli* O157:H7 em humanos apresenta manifestações clínicas que variam desde ausência de sintomas até a morte. Os principais sintomas são: diarreia não sanguinolenta, colite hemorrágica (CH), síndrome urêmica hemolítica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). O período de incubação médio da doença é de três dias, podendo variar entre um e oito dias e a maioria dos pacientes com CH melhora espontaneamente após sete dias. Vômitos ocorrem em 30-60% dos casos, e a febre, que geralmente é baixa, acontece em 30% dos pacientes. A SHU, primeiramente descrita em 1955 na Suíça apresenta três características clínicas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falência renal aguda. Pode ocorrer em todas as faixas etárias, mas é mais

comum em bebês e crianças e é a maior causa de falência renal na infância. A PTT pode ocorrer ou não associada aos casos de SHU. Quando associada, além dos sintomas da SHU ocorre também manifestação neurológica e febre. A prevalência é maior em crianças abaixo de cinco anos, decresce com o avanço da idade e volta a aumentar novamente em pessoas acima de 65 anos (Garcia, 2006).

A SHU é diagnosticada normalmente após seis dias do início do quadro de diarreia, sendo que 50% dos pacientes precisam fazer diálise e 75% necessitam de transfusão sanguínea. Complicações neurológicas agudas ocorrem em 25% dos pacientes. Complicações raras incluem pancreatite, *diabetis melitus*, efusão pleural ou do pericárdio. Dos pacientes com SHU, 3-5% vão a óbito (Garcia, 2006).

Mesmo com várias pesquisas sendo desenvolvidas, não existe tratamento efetivo disponível para infecções causadas por STEC. O uso de antibióticos em pacientes com STEC não é indicado, pois aumenta o risco de desenvolvimento de SHU, já que leva a liberação em abundância das toxinas do periplasma das bactérias presente no lúmen intestinal, aumentando seu nível na circulação sistêmica e sua apresentação às células endoteliais vasculares susceptíveis no glomérulo renal (Zhang et al., 2000; Tarr et al., 2005).

## **2.10- Principais reservatórios de STEC**

As STEC têm sido isoladas de diversos animais, como bovinos, ovinos, suínos, veados, cavalos, cães e pássaros. Na

América do Norte o principal reservatório de STEC são os bovinos, já na Austrália são os ovinos. Mais de 100 sorotipos de STEC já foram isolados de ovinos (Bettelheim, 2003; Blanco, 2003; Cookson, 2006) e mais de 435 sorotipos em bovinos (Beutin, 1993; Bettelheim, 2003; Blanco, 2004). Apesar de já ter sido isolada em suínos, os sorotipos de STEC usualmente detectados são específicos para essa espécie e associados à doença do edema (Fratamico, 2000; Johnsen, 2001).

Esse patógeno pode ser encontrado nas fezes de bovinos nas concentrações de  $10^2$  a  $10^5$  UFC/g de fezes podendo dessa maneira contaminar água e solo das fazendas (Cambell et al., 2001).

Apesar desse micro-organismo não fazer parte da microbiota do trato gastrointestinal das aves, Beery et al. (1985), verificaram experimentalmente que *E.coli* O157:H7 pode colonizar rapidamente o ceco do frango, sendo excretada nas fezes por vários meses. Entretanto, Chapman et al, 1997 avaliaram a presença de *E.coli* O157 em 1.000 amostras de “swab” do reto de frangos logo após o abate durante o período de um ano e não encontraram nenhuma amostra positiva.

### **2.11- Métodos de diagnóstico de *E.coli***

Por causa da baixa dose infectante, o diagnóstico de STEC em alimentos está se tornando de grande importância. É necessário dispor de métodos rápidos e confiáveis para detectar a presença de STEC em uma amostra suspeita. Os métodos de detecção de STEC são

aplicados principalmente em amostras de fezes de pacientes hospitalizados, que sofrem de HC e SHU e em indústrias de alimentos (Madic, 2010).

O isolamento de STEC de matrizes complexas é um desafio, pois essas podem conter níveis muito elevados de inibidores naturais que interferem com a detecção do patógeno. Devido à baixa dose infectante e a sensibilidade da detecção disponível e métodos de isolamento, uma etapa de enriquecimento é sempre executada em todos os métodos de diagnóstico, a fim de aumentar o número de células do patógeno a um nível detectável e para permitir a recuperação das células danificadas. A eficiência dessa etapa depende de três fatores: a temperatura, o período de incubação e a composição do caldo (Madic, 2010).

Os principais meios de enriquecimento utilizados para isolamento de *E.coli* O157:H7 são o caldo triptona de soja modificado (mTSB) e caldo *E.coli* (EC). Estes meios podem ser complementados com vários agentes seletivos como sais biliares, telurito de potássio e antibióticos, entre os quais a novobiocina é o mais utilizado. O método de referência da International Standard Organization (ISO 16654) para isolamento de *E.coli* O157 em alimentos recomenda a utilização do enriquecimento em meio mTSB adicionado de novobiocina a temperatura de 41,5°C por um período total de 18-24h. Porém diversos protocolos de enriquecimento têm sido relatados para o isolamento de STEC conforme quadro 2:

Quadro 2: Meios de enriquecimento usados para isolamento de STEC:

Finalidade do meio	Meio de cultura	Grupo/sorogrupo
Meio de enriquecimento não seletivo	Triptona de soja (TSB)	STEC
	TSB modificado (mTSB)	STEC
	Água peptonada tamponada	STEC
	Meio <i>E.coli</i> (EC)	STEC
Meio de enriquecimento seletivo	TSB+vancomicina+ telurito de potássio	O111
	TSB+vancomicina+ cefixime+ telurito de potássio	O26
	TSB+vancomicina+ rifampicina+ sais biliares + telurito de potássio	O26, O103, O111, 0145, O157
	mTSB + novobiocina	O157
	mTSB + acriflavina	O157
	mTSB + cefixime+ cefsulodina+ vancomicina	O157, O26
	Meio <i>E.coli</i> modificado + novobiocina	O157, STEC
	Água peptonada tamponada + vancomicina + cefsulodina + cefixime	O157
	Água peptonada +vancomicina	O26, 0111

Fonte: Adaptado de Madic, 2010.

### 2.11.1. Ensaio de citotoxicidade em cultivo celular:

Uma das maneiras de pesquisar a presença de STEC é através da pesquisa de toxina do tipo *shiga*, sendo o ensaio de citotoxicidade em cultivo celular um dos métodos disponíveis. O ensaio deve ser realizado em células Vero, pois essas são mais sensíveis a toxina do tipo *shiga*. É considerado um método “padrão Gold”, sendo usado para comparação para validar qualquer outro método. É utilizado como triagem, e em caso positivo deve ser feita confirmação por métodos mais específicos. É considerado um teste muito sensível, mas não é específico como os métodos moleculares. Além disso, é bastante trabalhoso, demorado e, de acordo com

os autores, necessita de cultivo celular que o torna inviável para a rotina laboratorial (Pigatto, 2008 ; Madic, 2010).

### 2.11.2. Inoculação em agar específico:

As propriedades bioquímicas específicas da *E.coli* O157 permitiram o desenvolvimento de agares específicos para detecção e isolamento de rotina, como o Agar MacConkey. Esse agar inibe o crescimento de bactérias Gram positiva devido à presença de sais biliares e cristal violeta. Devido à lactose presente no Agar, as bactérias fermentadoras da lactose como as da família *Enterobacteriaceae* formam colônias rosa nesse meio. Várias outros agares foram desenvolvidos a partir de

alterações no Agar MacConkey. A substituição da lactose pelo sorbitol no agar MacConkey, originou o SMAC. Como a *E.coli* O157:H7 não fermenta sorbitol ao crescer nesse agar ela forma colônias transparentes, diferente das demais *E.coli*. Outra opção é a adição da ramnose ao SMAC, originando o meio CR-SMAC que auxilia a inibição de outros micro-organismos que também não fermentam o sorbitol. Quando adicionado cefixime, ocorre a inibição do crescimento de *Proteus* spp.

Além do cefixime, pode ser adicionado o telurito de potássio, formando o meio CT-SMAC, permitindo somente o crescimento da *E.coli* O157:H7 (Pigatto, 2008; Madic, 2010).

### 2.11.3. Ensaios imunológicos:

Muitos ensaios imunológicos já foram desenvolvidos, estando disponível comercialmente em kits pronto para uso (quadro 3), o que é uma vantagem para rotina laboratorial, mas apresenta custo elevado (Bettelheim & Beutin, 2003)

Quadro 3: Métodos imunológicos comercializados e validados para detecção e isolamento de *E.coli* O157:H7 em alimentos

Teste	Antígeno alvo	Formato do resultado
EHEK-Tek (Organon Teknika)	O157 e H7	ELISA Colorimétrico
Tecra <i>E.coli</i> O157 VIA (Bioenterprises Pty Ltd)	O157	ELISA Colorimétrico
Assurance EHEC EIA (BioControl Systems Inc.)	O157 e H7	ELISA Colorimétrico
PATH-STIK <i>E.coli</i> O157 (Celsis Lumac)	O157	Colorimétrico Imunocromatográfico
VIP EHEC (BioControl Systems Inc.)	O157 e H7	Colorimétrico Imunocromatográfico
Transia Card <i>E.coli</i> O157 (Diffchamb)	O157	Colorimétrico Imunocromatográfico
REVEAL <i>E.coli</i> O157:H7 (Neogen)	O157 e H7	Colorimétrico Imunoensaio
ImmunoCard Stat! <i>E.coli</i> O57:H7 (Meridian Diagnostics)	O157 e H7	Colorimétrico Imunocromatográfico
Biocard EHEC (ANI Biotec OY)	O157	Colorimétrico Imunocromatográfico
Singlepath <i>E.coli</i> O157:H7 (Merck Ltd)	O157 e H7	Colorimétrico Imunocromatográfico
VIDAS <i>E.coli</i> O157 (BioMérieux)	O157	ELFA Fluorescente
EiaFoss <i>E.coli</i> O157 (Foss Eletric A/S)	O157	Fluorescente Imunoensaio

Fonte: Adaptado de Madic, 2010.

O sistema de separação imunomagnética é um tipo de ensaio imunológico e baseia-se em duas ações principais: a captura da célula alvo por ligação imunológica utilizando imunoglobulinas específicas para detecção do sorotipo, ligadas a microesferas magnéticas e a posterior precipitação e separação por ação de forças magnéticas. Essas duas etapas levam à separação específica de células bacterianas permitindo a posterior concentração e purificação do micro-organismo alvo (Liu & Li, 2002). Apesar da grande eficiência este método está disponível para poucos sorogrupos de *Escherichia coli* (O157, O111 e O26) (De Boer & Heuvelink, 2002). BioNobile (Turku, Finland) desenvolveu um dispositivo para separação magnéticas de partículas dentro de uma solução, chamada de PickPen<sup>®</sup>, que tem sido primariamente usada para transferência rápida de DNA, RNA e moléculas de proteína ligadas as partículas magnéticas. A BioControl System adotou a PickPen<sup>®</sup> em seu produto comercial Assurance GDS<sup>™</sup> *E.coli* O157:H7 e observou que a incorporação desse dispositivo ao processo de separação magnética melhorou a captura do micro-organismos alvo em detrimento à microbiota indesejável, sem comprometer a sensibilidade (Nou et al., 2006).

#### 2.11.4. Métodos moleculares:

Nos últimos anos, testes baseados na técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR) tornaram-se muito importante para detecção de bactérias. A PCR é uma técnica de biologia molecular que permite a replicação in

vitro do DNA de forma extremamente rápida. No PCR convencional os produtos de amplificação são detectados pela coloração de brometo de etídio no gel de agarose após separação por eleforese. No entanto, diversas variações de padrão de PCR têm surgido, dentre eles está o PCR multiplex e o PCR em tempo real. No PCR multiplex vários alvos podem ser amplificados na mesma reação devido a utilização de vários pares de *primers*. (Yoshitomi et al.2006)

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação de ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutividade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* ( $C_T$ ). Este permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o syber Green (SYBR<sup>®</sup> Green) e TaqMan<sup>®</sup>. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação. Os fluoróforos

são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em tempo real utilizam estas moléculas que proporcionam, o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos (Novais et al. 2004).

A técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada para detecção e quantificação de *E.coli* O157:H7 em alimentos e amostras clínicas (Oberst et al. 1998; Sharma et al. 1999; Bellin et al. 2001) O uso de sondas fluorogênicas específicas tem facilitado a detecção automatizada e quantificação do gene amplificado. A aplicação do PCR em tempo real oferece vantagens de ser mais sensível e rápido por não requerer procedimentos pós PCR para detectar produtos de amplificação, necessários nos procedimentos baseados em PCR convencional (Jinneman et al. 2003).

Para atender a necessidade das indústrias de alimentos que precisam garantir a segurança de seus produtos e para isso dispor de técnicas rápidas, precisas e automatizadas para detecção de STEC, vários kits comerciais

baseados em biologia molecular estão disponíveis. A maioria deles voltados para pesquisa do sorotipo *E.coli* O157:H7 e toxina do tipo *shiga*. O kit comercial Assurance GDS™ para *E.coli* O15:H7 (GDS EC O157:H7) é um método automatizado que utiliza sondas próprias e *primers* específicos dirigidos para uma sequência de DNA altamente conservada do organismo alvo. O GDS EC O157:H7 detecta linhagens de *E.coli* O157:H7 e linhagens toxigênicas não móveis de *E.coli*, como *E.coli* O157:NM. O método foi concebido para ser altamente seletivo e não detectar micro-organismos que são potenciais causadores de reação cruzada em testes baseados em anticorpos, incluindo *E.coli* O157 que não são H7 ou NM, e outros micro-organismos que expressam o antígeno O157, mas que não são *E.coli* O157:H7 (Feldsine et al.,2005)

Vários *primers* já foram desenhados para identificação de *E.coli* O157:H7 e de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga* através de PCR RT, no quadro 4 é possível visualizar alguns desses *primers* descrito pela literatura.

Quadro 4: *Primers* utilizados para detecção de *E.coli* O157:H7 e toxina através de PCR RT.

<i>Primer</i> ou Sonda *	Número de acesso no GenBank	Sequencia (5`-3`).
Stx1F934	M19473	GTGGCATTAACTGAATTGTCATCA
Stx1R1042	M19473	GCGTAATCCCACGGACTCTTC
Stx2F1218	X0785	GATGTTTATGGCGGTTTTATTTC
Stx2R1300	X07865	TGGAAACTCAATTTTACCTTTAGCA
Stx1P990	M19473	Rox-TGATGAGTTTCCTTCTATGTGTCCGGCAGAT-BHQ2
Stx2P1249	X07865	6FAM-TCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATT-BHQ1

Fonte: Adaptado de Jinneman et al., 2003.



\*Os nomes das sondas ou *primers* são compostos do gene alvo, as letras (F indica o *primer* forward, a letra R o *primer* reverse, a letra P a sonda) e a posição 5' do oligonucleotídeo.

## **2.12- Programas de Controle de Qualidade:**

Para aumentar a segurança e a qualidade dos alimentos, o sistema de inspeção deve ser realizado em conjunto com as práticas de garantia de qualidade, baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Estes princípios são recomendados por entidades internacionais como a Organização Mundial do Comércio (WTO), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial de Saúde (WHO) e MERCOSUL. A implantação do sistema é exigida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde e por países como Estados Unidos (FDA/CFSAN,1997) e países da União Européia (EFSA,2007).

Antes da implantação do sistema APPCC, dois pré-requisitos se fazem necessários, as BPF e os PPHO ou Procedimento Padrão Operacional (POP). A Portaria 1.428, do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL,1993), define Boas Práticas de Fabricação como normas e procedimentos que visam atender a um determinado padrão de identidade e qualidade de um produto ou serviço e que consiste na apresentação de informações referentes aos seguintes aspectos básicos: a)

Padrão de Identidade e Qualidade PIQ; b) Condições Ambientais; c) Instalações e Saneamento; d) Equipamentos e Utensílios; e) Recursos Humanos; f) Tecnologia Empregada; g). Controle de Qualidade; h) Garantia de Qualidade; i) Armazenamento; j) Transporte; k) Informações ao Consumidor; l) Exposição / Comercialização; m) Desinfecção / Desinfestação.

A Portaria 368, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1997a), aborda especificamente as BPF aprovando o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas para estabelecimentos industrializadores de alimentos, onde são estabelecidos os requisitos essenciais de higiene para alimentos destinados ao consumo humano.

A Portaria 326 da Secretaria de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1997b) ligada ao MS estabelece os requisitos gerais (essenciais) de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos/ fabricados para o consumo humano.

Os PPHO (Procedimentos Padrão de Higiene Operacional) do inglês SSOP (Standard Sanitizing Operating Procedures) são representados por requisitos de BPF considerados críticos na cadeia produtiva de alimentos. Para estes procedimentos, recomenda-se a adoção de programas de monitorização, registros, ações corretivas e aplicação constante de check-lists.

Os PPHO preconizados pelo FDA (Food and Drug Administration) constituíam, até outubro de 2002 a referência para o controle de

procedimentos de higiene, até que em 21/10/02 a resolução de nº 275 da Anvisa (MS), criou e instituiu aqui no Brasil os POP (Procedimentos Operacionais Padronizados) que vão um pouco além do controle da higiene, porém, não descaracterizam os PPHO, que continuam sendo recomendados pelo MAPA. O programa PPHO aborda os seguintes itens: potabilidade da água, higiene das superfícies de contato com o produto, prevenção da contaminação cruzada, higiene pessoal dos colaboradores, proteção contra contaminação do produto, agentes tóxicos, saúde dos colaboradores e controle integrado de pragas. Já o programa POP aborda: higienização das instalações, equipamentos, móveis e utensílios; controle da potabilidade da água; higiene e saúde dos manipuladores; manejo dos resíduos; manutenção preventiva e calibração de equipamentos, controle integrado de vetores e pragas urbanas; seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens e programa de recolhimento de alimentos. Os PPHO ou os POP e as BPF, vão dar o suporte necessário para que o sistema APPCC não desvie do seu objetivo de ser focal e, possa agir em pontos cruciais, onde as ferramentas anteriores não conseguiam atuar, porém, elas vão auxiliar muito na redução de custos e esforços. Observa-se também que os POP contemplam alguns itens do manual de boas práticas, sendo um pouco mais abrangente que os PPHO. Tanto a Portaria 1428 (MS), quanto a 46/98 (MAPA), preconizam os mesmo quesitos para BPF, com pequenas diferenças (Ribeiro-Furtini et al., 2006).

A circular n ° 175 do MAPA (BRASIL, 2005), estabelece Programas de Autocontrole que serão sistematicamente submetidos à verificação oficial de sua implantação e manutenção. Estes Programas incluem o Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional – PPHO, o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC e, num contexto mais amplo, as Boas Práticas de Fabricação – BPFs.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de carcaças de frangos foram coletadas, diretamente das indústrias (abatedouros avícolas), pelas coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Estadual do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizadas no Estado de Minas Gerais. As mesmas foram enviadas, em caixa isotérmica com gelo reciclável, ao Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária, localizado no CEASA, onde foram realizadas as análises de pesquisa de *E. coli* O157:H7 e de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga*, nas carcaças.

Foram recebidas amostras congeladas e resfriadas, de acordo com a forma de comercialização de cada estabelecimento.

#### 3.1- Amostras

Para maior representatividade da região, o Estado de Minas Gerais foi dividido em doze mesorregiões, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e

Estatística (IBGE) conforme descrito abaixo e ilustrado na figura 1.

- a) Campo das Vertentes, compreendendo 3 micro regiões e 36 municípios
- b) Central mineira, compreendendo 3 micro regiões e 30 municípios
- c) Jequitinhonha, compreendendo 6 micro regiões e 53 municípios
- d) Metropolitana de Belo Horizonte, compreendendo 8 micro regiões e 105 municípios
- e) Noroeste de Minas, compreendendo 2 micro regiões e 19 municípios
- f) Norte de Minas, compreendendo 7 micro regiões e 89 municípios

- g) Oeste de Minas, compreendendo 5 micro regiões e 44 municípios
- h) Sul e Sudoeste de Minas, compreendendo 10 micro regiões e 146 municípios
- i) Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, compreendendo 7 micro regiões e 20 municípios
- j) Vale do Mucuri, compreendendo 2 micro regiões e 23 municípios
- k) Vale do Rio Doce, compreendendo 7 micro regiões e 99 municípios
- l) Zona da Mata Mineira, compreendendo 7 micro regiões e 142 municípios

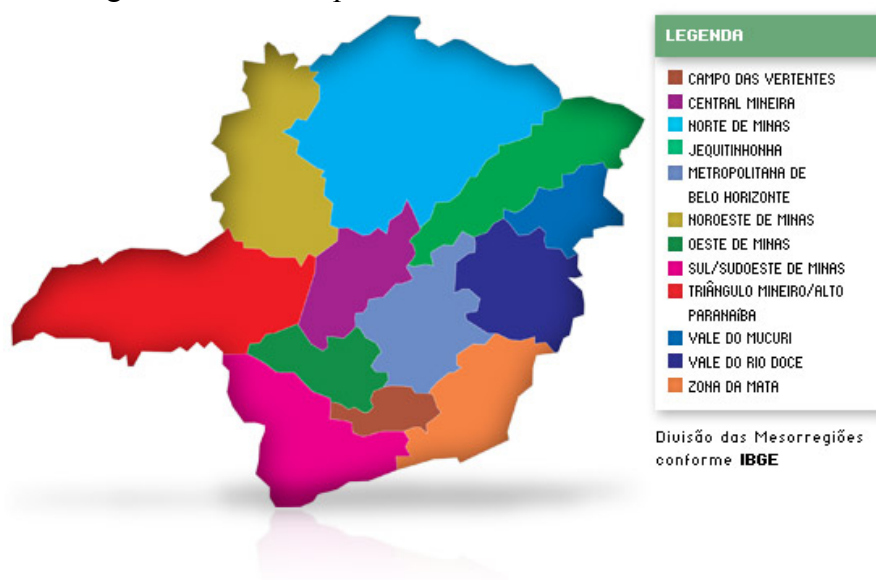


Figura 1: Mesorregiões de acordo com IBGE

Depois de determinada as mesorregiões, foram verificados em quais delas existiam estabelecimentos fiscalizados pelo SIF e pelo IMA. Em seguida foi

sorteado aleatoriamente, por mesorregiões e por sistema de inspeção um estabelecimento produtor de carne de frango conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1- Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião e por sistema de fiscalização.

Produto	Localização dos estabelecimentos		
		SIF	IMA
	Mesorregião	Município	Município
Frangos	Triângulo Mineiro	Uberaba	Araguari
	Metropolitana	Pará de Minas	Itabira
	Sul e Sudeste	Passos	Alfenas
	Campo das Vertentes	Barbacena	Lavras
	Oeste	São Sebastião do Oeste	Igaratinga

Para cada estabelecimento foram realizados três coletas durante o período de setembro de 2010 a maio de 2011, sendo encaminhadas para análise 06 amostras por coleta (onde cada uma foi considerada uma repetição), totalizando 180 amostras.

### 3.2- Pesquisa de *E. coli*

Em teste preliminar foi pesquisado a presença de coliformes termotolerante em todas as carcaças utilizadas neste estudo pela metodologia do SimPlate<sup>®</sup> (BioControl System) (AOAC, 2005.03). Essas análises foram feitas para avaliar se as carcaças continham coliformes termotolerantes, o que poderia indicar a possibilidade da presença de *E.coli* O157:H7, uma vez que os coliformes são indicadores sanitários

### 3.3- Pesquisa de *E.coli* O157:H7

A técnica de PCR- em tempo real através do equipamento Assurance GDS<sup>™</sup> foi utilizada para pesquisa da presença de *E.coli* O157:H7 de acordo com a metodologia oficial (AOAC, 2005.04) e para pesquisa de toxina do tipo *shiga* de acordo com a metodologia oficial (AOAC, 2005.05).

#### 3.3.1- Preparo das amostras

Foram pesadas 25 gramas de cada amostra em sacos estéreis, aos quais foram adicionados 225 mL do caldo BioControl Modified EHEC-mEHEC<sup>™</sup> (BioControl Systems). Os sacos estéreis contendo as amostras e os meios de cultura foram colocados na homogeneizadora de amostra- tipo Stomacher e em seguida incubados à  $42,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 18 horas.

### 3.3.2- Preparo da Enzima DNA polimerase

Para a análise de PCR foi utilizada a polimerase JumpStart™ *Taq* DNA. Para torná-la funcional, a enzima *Taq* DNA polimerase foi preparada de acordo com metodologia oficial (AOAC, 2005.a), adicionando ao frasco da *Taq* DNA polimerase, 0,9 ml do tampão de diluição da polimerase (BioControl Systems). Essa solução foi aspirada três vezes com auxílio de uma pipeta e em seguida o conteúdo total do frasco da enzima foi transferido para o tubo do tampão de diluição da polimerase. Em seguida o tudo foi invertido cinco vezes para homogeneizar a solução. A data do preparo foi registrada no tubo e a solução foi mantida sob refrigeração e utilizada num prazo de 30 dias após seu preparo.

### 3.3.3- Metodologia de Análise por PCR

Na primeira etapa do preparo das amostras, foi utilizado um bloco de preparo da amostra, onde cada poço foi destinado para uma amostra. Foi adicionado a cada poço 20µL do reagente de concentração (BioControl System) (figura 2), e em seguida 1,0 mL da amostra incubada (Figura 3).

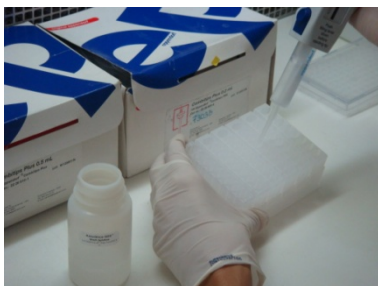


Figura 2: Bloco de preparo da amostra- 20µL do reagente de concentração



Figura 3: Bloco de preparo da amostra- 1,0ml da amostra incubada

Imediatamente após, amostra foi recolocada à temperatura de  $42,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e um filme adesivo foi colocado sobre a placa de preparo para evitar que a mesma derramasse no momento da homogeneização. Para homogeneizar o bloco de preparo da amostra foi colocado no equipamento Assurance GDS Vortex™ (BioControl System) numa velocidade de 900 rpm por 15 minutos (Figura 4)



Figura 4: Equipamento Assurance GDS Vortex™

Enquanto a placa de preparo da amostra estava no homogeneizador, na placa de ressuspensão foi adicionado 35 µL do tampão de ressuspensão (BioControl System) em cada poço (Figura 5):

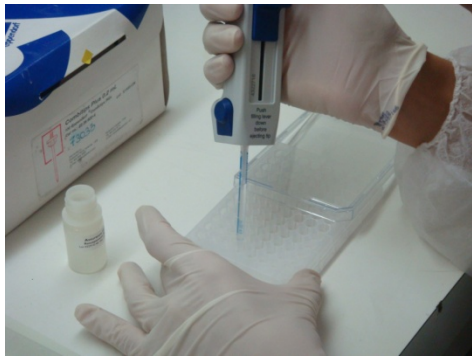


Figura 5: bloco de ressuspensão da amostra  
35  $\mu$ L do tampão de ressuspensão

Depois as placas de preparo da amostra e ressuspensão foram colocadas uma ao lado da outra para que fosse transferido o conteúdo para a placa de ressuspensão. Para isso foi utilizado a ponteira PickPen<sup>®</sup> (BioControl System). Com as ponteiros magnéticos estendidas a PickPen<sup>®</sup> foi introduzida no interior dos poços da placa de preparo da amostra e durante 30 segundos foi feito movimento circular lentamente, sendo em seguida retirada a ponteira da placa de preparo e colocada na placa de ressuspensão onde as ponteiros magnéticas foram retraídas para liberar a amostra no poço contendo o tampão de ressuspensão (figura 6):

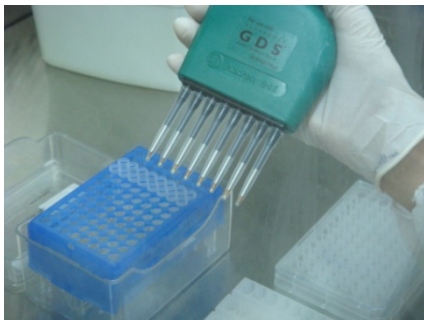


Figura 6: Uso da PickPen<sup>®</sup>

Em seguida foi retirado da refrigeração (2-8°C), o bloco de alumínio (BioControl System), onde os

microtubos contendo os reagentes liofilizados para *E.coli* O157:H7 (BioControl System) foram encaixados (Figura 7):

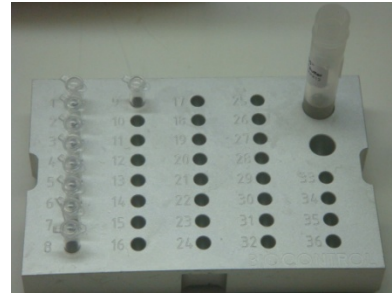


Figura 7: Bloco de alumínio

Os microtubos foram abertos e adicionados a eles 10 $\mu$ L da solução da polimerase preparada e armazenada sob refrigeração (figura 8) e 20 $\mu$ L do material do bloco de ressuspensão (figura 9). Em seguida os microtubos foram fechados e invertidos três vezes para homogeneizar a amostra com a polimerase e o material liofilizado (Figura 10). E como última etapa os microtubos foram colocado no instrumento de amplificação e detecção Assurance GDS Rotor-Gene<sup>™</sup> (BioControl System) para que a reação de amplificação fosse iniciada (Figura 11).



Figura 8: Microtubos- 10 $\mu$ L da solução da polimerase preparada e armazenada sob refrigeração



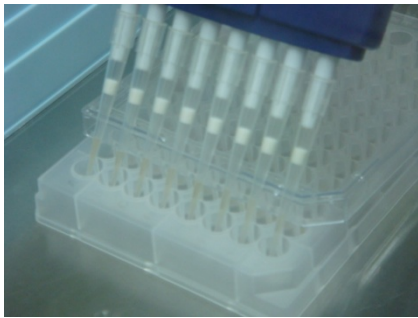


Figura 9: Microtubos-20 $\mu$ L do material do bloco de ressuspensão



Figura 10: Homogeneizando conteúdo dos microtubos



Figura 11: Equipamento Assurance GDS Rotor-Gene™

As amostras positivas para *E.coli* O157:H7 seriam analisadas para produção de toxina do tipo *shiga* toxina de acordo com a AOAC2005.05.

### 3.4- Delineamento experimental

O ensaio, das análises, foi conduzido no delineamento experimental inteiramente ao permitido. Com esses dados foi possível verificar que as condições higiênicas dos estabelecimentos sob fiscalização

acaso e os resultados foram analisados através da estatística descritiva .

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo preliminar foi identificado contaminação por coliformes termotolerantes em 90% das amostras, sendo que 35% estavam fora do padrão estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA, 2001). No quadro 5 é possível verificar a distribuição da contaminação por coliforme termotolerante de acordo com o sistema de inspeção e a meso- região.

Todos os 10 estabelecimentos envolvidos no projeto apresentavam contaminação por coliformes termotolerantes, sendo que em apenas 01 estabelecimento sob fiscalização federal (MAPA), localizado na meso região sul e sudeste o nível de contaminação estava dentro dos limites padrões, sendo, portanto própria para o consumo. De acordo com Barros et al. (2007) a qualidade microbiológica da carne é altamente influenciada pelas condições higiênicas, portanto os dados encontrados demonstram que nesses estabelecimentos o fator higiene durante a produção não estava adequado. Do total de 90 amostras coletadas sob fiscalização estadual, 62% estavam contaminadas por coliformes termotolerantes sendo 26% imprópria para consumo; já outros 90 estabelecimentos sob fiscalização federal 27% das amostras estavam contaminadas sendo 9% fora do limite permitido. Com esses dados foi possível verificar que as condições higiênicas dos estabelecimentos sob fiscalização

estadual estavam piores do que as dos estabelecimentos sob fiscalização federal.

Quadro 5: Distribuição da contaminação por coliformes termotolerantes por meso-região e tipo de fiscalização:

Meso-região	Tipo de fiscalização	% de amostras contaminadas	% de amostras fora do padrão da legislação
Sul e Sudeste	IMA	78%	17%
	MAPA	22%	0%
Oeste	IMA	55%	39%
	MAPA	44%	17%
Metropolitana	IMA	44%	5%
	MAPA	33%	17%
Triângulo Mineiro	IMA	39%	5%
	MAPA	22%	5%
Campos das Vertentes	IMA	94%	67%
	MAPA	17%	5%
Todas amostras	IMA	62%	27%
	MAPA	28%	9%
Total Geral	IMA +MAPA	90%	35%

Apesar de no estudo preliminar ter sido verificado a presença de amostras contaminadas por *E.coli*, em nenhuma amostra foi isolado linhagens de *E.coli* O157:H7, conseqüentemente não foi realizada a pesquisa de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga*. Esses resultados corroboram com os resultados de Lee et al. (2009) que inicialmente identificaram a presença de *E.coli* e posteriormente fizeram a caracterização dos isolados, e apesar de terem isolado linhagens de EHEC nas amostras testadas, incluindo amostras de carne de frango, de boi e de suíno, nenhuma delas era *E.coli* O157:H7.

Também, Alonso et al. (2012) apesar de terem isolado linhagens de STEC em 5% dos produtos de frango testados nenhuma linhagem de *E.coli* O157:H7

foi encontrada. Embora tenha sido isolada linhagem de STEC dos produtos de frango, somente 0,1% dos *swabs* de cloaca foi positivo para STEC o que de acordo com os autores a contaminação por STEC nas amostras de frango provavelmente foi resultante de contaminação cruzada durante o manuseio especialmente nos açougues.

Tutenel et al., (2003) isolaram 96 amostras de *E.coli* O157 de amostras de frango através do equipamento Vidas ECO<sup>TM</sup>, porém ao utilizar a IMS nenhuma amostra foi confirmada como *E.coli* O157. No presente trabalho, como foi utilizado um kit comercial preparado para isolamento de *E.coli* O157:H7, não é possível fazer nenhuma afirmação a respeito da *E.coli* O157.



Diferente do presente trabalho onde as amostras de carcaça de frango foram coletadas nas câmaras frias dos matadouros frigoríficos e encaminhadas diretamente para o laboratório onde foram analisadas, nos trabalhos onde foram isolado *E.coli* O157:H7 nas carcaças de frango ou derivados de carne de frango (Doyle and Schoeni,1987; Adbul Raouf et al.,1996; Akkaya et al., 2006; Chinen et al., 2009) as amostras foram coletadas em supermercados e açougues, locais onde produtos cárneos de outras espécies também são comercializados, podendo nestes casos haver contaminação cruzada das carnes de frangos e carnes de outras espécies animais naturalmente contaminadas ou por contato em superfícies contaminadas (Biofilme).

De acordo Adbul Raouf et al.,(1996), apenas um terço dos consumidores egípcios são conscientes da necessidade de se manusear separadamente carnes cruas de outros alimentos. Segundo os autores a presença de *E.coli* O157:H7 nos alimentos pesquisados, pode ser justificada pela ocorrência de contaminação cruzada durante o manuseio dos mesmos, não sendo descartada a possibilidade da contaminação da água por esse micro-organismo.

Para Akkaya et al.,2006 a presença de *E.coli* O157:H7 em frango sugere que o frango seja um reservatório desse micro-organismos ou que possa ter ocorrido a contaminação durante seu transporte ou através da água utilizada em várias etapas do abate de frangos.

Chinen et al., (2009) ao pesquisar *E.coli* O157:H7, encontraram linhagens idênticas desse micro-organismo em

amostras de diferentes restaurantes, em produtos cozidos e não cozidos, em produtos de carne bovina e em produtos de carne de frango, em períodos diferentes de amostragem em um mesmo restaurante, e em hambúrguer de frango e em carcaça de frango coletadas no mesmo período. De acordo com estes autores, a presença de linhagens idênticas em diferentes restaurantes, sugere a ocorrência de fonte comum de contaminação, provavelmente na planta de processamento ou durante o transporte. A presença de linhagens idênticas nos produtos crus e cozidos provavelmente ocorreu devido ao mau cozimento do produto ou por contato do produto cozido com o produto cru ou com superfícies contaminadas. A provável justificativa para a presença de linhagens idênticas entre amostras de frango e bovina é que tenha ocorrido contaminação cruzada vinda da amostra bovina, que pode ter ocorrido no restaurante ou em etapas anteriores do processamento. Para a presença de linhagens idênticas entre hambúrguer de frango e carcaça de frango os autores não puderam descartar a hipótese de contaminação durante o abate, resfriamento ou transporte.

No presente trabalho, a ausência de contaminação das carcaças de frango por *E.coli* O157:H7 não foi influenciada pela forma de conservação (congelada ou resfriada) e nem pelo tipo de fiscalização presente no estabelecimento (federal ou estadual) . As amostras foram coletadas em indústrias de aves, que não possuem carne de qualquer outro tipo de espécie animal, sendo, portanto improvável a presença deste micro-organismo.

Porém faz-se necessária a vigilância quanto ao emprego das Boas Práticas de Fabricação (BPF's), do Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) de forma a minimizar os índices de contaminação por coliformes termotolerantes. Apesar de já existirem legislações que regulamentam esses programas desde 1997, muitas indústrias ainda não os possuem implementados, muitas vezes pela dificuldade de se formar uma equipe multidisciplinar realmente envolvida, necessária para esse processo. O princípio básico desses programas é a higiene durante a produção, portanto os índices de contaminação por coliformes termotolerantes é uma boa ferramenta para se ter uma noção da quanto esses programas estão funcionando na indústria.

## 5- CONCLUSÃO

Apesar da alta contaminação por coliformes termotolerantes, as carcaças de frango obtidas dos abatedouros das diversas regiões do Estado de Minas Gerais não representam um risco para a saúde pública com relação à presença de *E.coli* O157:H7 e de linhagens produtoras de toxina do tipo *shiga*.

Não existe diferença entre os estabelecimento com fiscalização federal e estadual quanto a ocorrência de *E.coli* O157:H7 em carcaças de frango.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abdul-Raouf, U.M.; Ammar, M.S.; Beuchat, L.R. *Isolation of Escherichia*

*coli* O15:H7 from some Egyptian foods. International Journal of Food Microbiology 29, p.423-426. 1996.

Akkaya, L; Atabay, H.I.; Kenar, B. et al. *Prevalence of verocytotoxigenic Escherichia coli O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey*. Bull Vet Inst Pulawy 50, p. 513-516, 2006.

Almeida Filho, E. S.; Sigarini, C.O.; Borges, N.F.; Delmondes, E.C et al. *Pesquisa de Salmonella ssp em carcaças de frango (Gallus gallus), comercializadas em feira livre ou em supermercado no município de Cuiabá, MT, Brasil*. Higiene Alimentar, v. 17, n. 110, p. 75-76, 2003.

Alonso, M.Z.; Lucchesi, P.M.A.; Rodriguez, E.M. et al. *Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic Escherichia coli (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores*. Food Control 23, p. 351-355, 2012.

ANVISA . Resolução nº12, de 2 de janeiro de 2001. [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm), acesso em 10/12/2011.

AOAC Official Method 2005.03. *Detection and quantitation of Coliforms and E.coli in foods*. Journal of AOAC International, 88, 1318, 2005.

AOAC Official Method 2005.04. *Escherichia coli O 157:H7 in Selected Foods*. Journal of AOAC International, 88, 1334 ,2005.

AOAC Official Method 2005.05. *Shigatoxin genes, from E. coli O*

157:H7 in Selected Foods. Journal of AOAC International, 88, 1334, 2005.

Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Monteiro, A.A. et al. *Identificação dos principais pontos de contaminação por microorganismos indicadores de higiene em plantas de processamento de carnes*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(4): 856-862, out.-dez., 2007.

Beery, J.T.; Doyle, M.P.; Schoeni, J.L. *Colonization of chicken cecae by Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis*. Appl. Environ. Microbiol. 49: p. 310-315. 1985.

Bellin T.; Pulz, M.; Matussek, A. e al., *Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes*. J Clin Microbiol 39:370–374,2001.

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

Besser, R.E.; Griffin, P.M.; Slutsker, L. *Escherichia coli O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease*. Annu. Rev. Med. 50:355-367, 1999.

Bettelheim, K. A.; Beutin, L. *Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) Escherichia coli (VTEC/STEC)*. Journal of Applied Microbiology, Whashington, v. 95, n. 1, p. 205-217, 2003

Beutin, L.; Geier, D.; Steinruck, H. et al. *Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)- producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals*. J.Clin. Microbiol. 31: 2483-2488, 1993.

Blackburn D.; Husband A.; Saldana Z. et al. *Distribution of the Escherichia coli common pilus (ECP) among diverse strains of human enterotoxigenic E. coli*. J Clin Microbiol . June; 47(6): 1781–1784, 2009.

Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A. et al. *Serotypes, virulence genes, and intimin types os shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from healthy sheep in Spain*. J.Clin. Microbiol.41:1351-1356, 2003

Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A. et al. *Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi)*. J. Clin. Microbiol. 42: 645-651, 2004.

Blanco, M., Schumache, S., Tasara, T. et al. *Serotypes, intimin variants and others virulence factors of eae positive Escherichia coli strains isolates from healthy cattle in Switzerland. Identification a new intimin variant gene (eae-eta2)*. BMC Microbiol. 5:23. 2005.

Boerlin, P.; McEwen, S.A.; Boerlin-Petzold, F. et al. *Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans*. Clin. Microbiol. 37: 497-503, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria n. 1428, de 26 de novembro de 1993. Dispõe sobre o controle de qualidade na área de alimentos.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 18415-9, 2 dez. 1993. Seção I

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Portaria n.368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiénico- Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/ Industrializadores de Alimentos.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, p.19697, 08 de set., 1997. Seção1. 1997a

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria n. 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o regulamento técnico Condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 16560- 3, 1 ago. 1997. Seção I. 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. *Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução- RDC n°12, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores de Alimentos e a*

*Lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 126, 23 de out. 2002. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular n° 175 de 16 de maio de 2005. *Dispõe sobre os procedimentos de verificação dos Programas de Autocontrole (Versão Preliminar).*

Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T. (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 2. New York: Spring Science + Business Media Inc., 2005.

Brett, K.N.; Ramachandran, V.; Hornitzky, M.A. et al. *Stx1 is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin producing Escherichia coli isolates from sheep but not among isolates from cattle.* J. Clin. Microbiol. 41: 926-936, 2003.

Brunder W.; Khan A. S.; Hacker J.; Karch H. *Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H(-).* Infect Immun 69, 4447-4457, 2001

Cambell, G.R.; Prosser, L.; Glover, A. et al. *Detection of E.coli O157:H7 in soil and water using multiplex PCR.* Journal of Applied Microbiology 91, 1004-1010, 2001.

Cardoso, L.; Araujo, W. M. C. *Parâmetros de Qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997-2001.* Higiene Alimentar, Brasília, v.17, n.113, p.12-19, 2001.

- Cookson, A.L.; Taylor, S.C.; Bennett, J. et al. Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in lower North Island, New Zealand. *N.Z.Vet. J.* 54:78-84, 2006
- Doyle, M.P.; Schoeni, J.L. ***Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meats and poultry.*** Applied and Environmental Microbiolog, October., p. 2394-2396. 1987.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Morbidity and Mortality Weekl Report. ***Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks- United States, 2008.*** September 9, 2011. V.60, N°35, p. 119-1202, 2011.
- Chapman, P.A.A; Siddons, C.A.; Cerdan Maio, A.T. et al. ***11-year study of Escherichia coli O157 in cattle, sheep, pigs ad poultry.*** Epidemiol. Infect. 119:245-250, 1997.
- Chinen,I.; Epszteyn, S.; Melamed, C.L. et al. ***Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina.*** International Journal of Food Microbiology v.132, p. 167-171, 2009.
- Cotta, T.; Delpech, P. ***Características sensoriais da carne de frangos segundo o grau de contaminação bacteriana das carcaças.*** A Hora Veterinária, ano 20, n. 115, p.44-47, 2000.
- CVE/SES-SP- Normas e Instruções 2002 ***Vigilância Ativa Doenças Transmitidas por Alimentos.*** Manual disponível no site da CVE em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>, em
- Doenças Transmitidas por Alimentos. Acesso em 20/04/2010.
- Delazari, I. ***Aspectos microbiológicos ligados a segurança e a qualidade da carcaça de aves.*** In: Semana Acadêmica veterinária, 8., 1998, São Paulo. Anais. São Paulo, p. 71-77, 1998.
- De Boer, E.; Heuvelink, A. E. ***Methods for the detection and isolation of Shiga toxin producing Escherichia coli.*** *Simposium Series Society for Applied Microbiology*, WASHINGTON, v. 29, p. 133-143, 2002.
- EFSA ***Monitoring of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types: Scientific opinion of the panel on biological hazards.*** EFSA J 579:1–61, 2007.
- Ethelberg, S.; Olsen, K.E.; Scheutz, F. et al. ***Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark.*** Emerg. Infect. Dis. 10: 842-847, 2004.
- Feldsine, P.T.; Green, S.T.; Lienau, A.H. et al. ***Evaluation of the Assurance GDS™ for E.coli O157:H7 Method and Assurance GDS™ for Shigatoxin Genes Method in selected foods: Collaborative study.*** Journal of AOAC International vol. 88, N°5, 2005.
- Franco,B.D.G.M.F; Landgraf,M. ***Microbiologia dos alimentos.*** In: LANDGRAF, M. ***Microorganismos indicadores.*** Ed. Atheneu, cap.3, p. 27-31, 2008
- Fratamico, P.M.; Bagi, L.K.; Bush, E.J. et al. ***Prevalence and characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli in swine feces recovered in the***

*National Animal Healthy Monitoring System's Swine 2000 study*. Appl. Environ. Microbiol. 70:7173-7178, 2000.

Garcia, P. M. *Detecção de Escherichia coli O157: H7 em leite por um método*

Gyles, C.L. *Shiga toxin-producing Escherichia coli: Na overview*. Anim. Sci. 2007. 85:E45-E62, 2007.

Hacker, J.; Blum-Oehler, G.; Janke, B. et al. Chapter 04 *Pathogenicity Islands of Extraintestinal Escherichia coli. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. American Society for Microbiology. Washington D.C. p. 59-76. 1999.

Jay, J.M. *Gastroenterite de origem alimentar causada por Escherichia coli*. In: Microbiologia de Alimentos. Ed. ArtMed. Cap.27, p.656-582.2005.

Johnsen, G.; Wasteson, Y.; Heir, E. et al. *Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999*. Int. J. Food Microbiol. 65: 193-200, 2001.

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

Jinneman, K.C.; Yoshitomi, K.J.; Weagant, S.D. *Multiplex Real-Time PCR Method to Identify Shiga Toxin Genes stx1 and stx2 and Escherichia*

*convencional e por reação em cadeia da polimerase (PCR)*. 2006. 68 f. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal)* Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

*coli O157:H7/H Serotype*. Applied and Environmental Microbiology, October, p. 6327-6333, 2003.

Johnson J. R.; Jelacic S.; Schoening L. M. et al. *The IrgA homologue adhesin iha is an Escherichia coli virulence factor in murine urinary tract infection*. Infect. Immun. 73, 965-971, 2005.

Kaper, J.B., Natarro, J.P., Mobley, H. *Pathogenic Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2: 123-140, 2004.

Konowalchuck, J.; Speirs, J.I.; Stavric, S. *Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli*. Infection and Immunity, v.18, n.3, p.775-779. Dec. 1977

Krause, G., Zimmerman, S., Beutin, L. 2005. *Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive Escherichia coli types*. Vet. Microbiol. 106: 87-95.

Large, T.M., Walk, S.T.; Whittam, T.S. *Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 71:2493-2500, 2005.

Lee, G.Y.; Jang, H.I.; Hwang, I.G. et al. *Prevalence and classification of pathogenic Escherichia coli isolated*

*from fresh beef, poultry, and pork in Korea.* International Journal of Food Microbiology v.134 p. 196–200. 2009.

Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., et al. *A DNA probe to identify enterohemorrhagic Escherichia coli of O157:H7 and other serotype that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome.* The Journal of Infectious Disease. v.156, n.1,p, 175-182.July 1987.

Liu Y.; Li, Y. *Detection of Escherichia coli O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement.* Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 1673, p. 1-9, 2002

Louise, C.B.; Kaye, S.A.; Boyd, B. et al. *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin.* Infect. Immun. 63: 2766-2769, 1995.

Low A. S.; Holden N.; Rosser T. et al. *Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7.* Environmental Microbiology 8, 1033-1047, 2006.

Madic, J. *Methods for detection of shiga-toxin producing Escherichia coli (STEC).* Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi. Part 2, 53-86, 2010.

McKee M. L.; Melton-Celsa A. R.; Moxley R. A. et al. *Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig*

*intestine and to adhere to HEp2 cells.* Infect Immun 63, 3739-3744, 1995.

Nataro, J.P; Kaper, J.B. *Diarrheogenic Escherichia coli.* Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201, 1998.

Nou, X.; Arthur, T.M.; Bosilevac, J.M.et al. *Improvement of Immunomagnetic Separation for Escherichia coli O157:H7 Detection by the PickPen Magnetic Particle Separation Device.* Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 12, , p. 2870–2874,2006.

Novais, C.M.; Pires-Alves, M. *PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia Polimerase (PCR).* Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Edição nº33, julho/dezembro, p.10 a 13,2004

Oberst, R.D.; Hays, M.P.; Bohra, L.K. et al. *PCR based DNA amplification and presumptive detection of Escherichia coli O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5`nuclease (TaqMan) assay.* Appl. Environ. Microbiol. 64:3389-3396, 1998.

O'Brien, A.D.; Laveck, G.D.; Thompson, M.R. et al. *Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli.* Journal Infection Disease v.146, p.763-769, 1982.

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

Pigatto, C.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) isoladas de bovinos de corte do estado do Paraná.** 2008. F.98. *Dissertação (Mestrado)*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.

Pillai, S.D., Jesudhasan, P.R. **Quorum sensing: how bacteria communicate.** *Food Technology* 60, 42-50, 2006.

Robert Koch Institute. EHEC Erkrankung. In: *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004*. Berlin, Germany: Robert Koch Institute, 2005:69

Ribeiro-Furtini, L.L.; Abreu, L.R. **Utilização de APPCC na indústria alimentos.** *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v.30,n.2, p.358-363,mar./abr., 2006.

Rivas, M.; Miliwesbky, E.; Chinen, I. et al. **The Case-Control Study Group. Characterization and epidemiologic subtyping of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina.** *Foodborne Pathog. Dis.* 3: 88-96, 2006.

Rumjanck, N.G.; Fonseca, M.C.C; Xavier, G.K. **Quorum sensing em sistemas agrícolas. Comportamento multicelular em procariota via comunicação intercelular.** *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Edição nº33, julho – dezembro, p.35-50, 2004.

Sharma, V.K.; Dean-Nystrom, E.A.; Casey, T.A. **Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan)**

**for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxinogenic *E. coli*.** *Mol Cell Probes* 13:291–302, 1999.

Sigarini, C.L. **Avaliação bacteriológica da carne bovina desossada em estabelecimentos comerciais do município de Cuiabá- MT/Brasil.** 2004. 95f. *Dissertação (Mestrado)* - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói.

Silagyi, K.; Kim,S.H.; Lo, Y.M. et al. **Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products.** *Food Microbiology* 26, 514-519, 2009.

Silva Jr, E.A. **Manual de Controle Higiénico-Sanitário em Alimentos.** 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SVS-MS. Boletim Eletrônico Epidemiológico. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999-2004.** Ano 05, Nº 06, 28/12/2005.

SVS-MS. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011\*.** Fontes: Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentos (UHA), Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis (CGDT), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2011.

SVS,2008Fonte:COVEH/CGDT/DEVE P/SVS/MS.[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31758](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758) Acesso em 21/04/2010.



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

Tatsuno I.; Horie M.; Abe H. et al. **ToxB gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype**. Infect Immun. 69, 6660-6669, 2001.

Teixeira, J.P. **Efeito das proteínas do soro de leite sobre a colonizaçãode *Escherichia coli* O157: H7 na mucosa intestinal de camundongos balb/c**. 2008. 48f. *Dissertação (Mestradoem Medicina Veterinária)- Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.*

Tutenel, A.V.; Pierard, D.; Van Hoof, J. et al. **Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter**. International Journal of Food Microbiology 84, p. 63-69, 2003.

Torres A. G., Zhou X., Kaper J. B. **Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells**. Infect Immun. 73, 18-29, 2005.

UBA- União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2011. [http://www.abef.com.br/uba/uba\\_relatorios\\_anuais.php](http://www.abef.com.br/uba/uba_relatorios_anuais.php) acesso em 05/01/2012.

Uhlich, G.A.; Cooke, P.H.; Solomon, E.B. **Analysis of the red-dry-rough phenotype of na *Escherichia coli* O157:H7 srtain and its role in biofilm formation and resistance to**

**antibacterial agents**. Applied and Environmental Microbiology 72, 2564-2572. 2006.

Zhang, W. L.; Bielaszewska, M.; Liesegang, A. et al. **Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains**. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 38, n. 6, p. 2134-2140, 2000.

Yoshitomi, K.J.; Jinneman, K.C.; Weagant, S.D. **Detection of shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93uidA mutation of *E.coli* O157:H7/H- using STBR Green I Iná real-time mutiplex PCR**. Mol Cell Probes 20: 31-41, 2006.