

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Josete Baialardi Silveira
(Nutricionista - IMEC)

Investigação de *Escherichia coli* O157: H7 em carne moída no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para Obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Porto Alegre
2010

Josete Baialardi Silveira
(Nutricionista – IMEC)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:
Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

JOSÉ MARIA WIEST
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

Prof. Dr. ADRIANO BRANDELI
ICTA/UFRGS

Profa. Dra. MERCEDES PASSOS GEIMBA
PUC/RS

Dra. MARTA RIVAS
INEI/ANLIS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu Pai maior, pela saúde e proteção e de ter me concedido realizar este trabalho.

Em segundo, quero agradecer a uma pessoa que sempre será eterna e viva em meu coração, pelos ensinamentos e sabedoria e que sempre acreditou em mim, meu pai José.

Agradeço a minha querida mãe pela dedicação com seus filhos e netos e que sempre esteve pronta a nos ajudar e auxiliar nos momentos mais difíceis.

Agora quero agradecer a toda família que sempre estiveram presentes em minha vida e que são as pessoas mais importantes para mim, especialmente meus filhos Mariana e Ramiro. Ao Luiz Paulo pelos nossos filhos maravilhosos. Aos meus irmãos, Clóvis e Samuel pela amizade e a minha irmã Kátia, por sempre me ajudar emocionalmente e espiritualmente.

Ao meu orientador Eduardo, pelas orientações prestadas, pelos ensinamentos de microbiologia, por me dar à maior força para fazer Mestrado e também porque sempre acreditou em meu potencial.

Agradeço também a Suzana Costalunga Lima, Diretora da Divisão de Vigilância Sanitária do RS, acima de tudo amiga, que sempre me deu a maior força para realizar esse Mestrado.

Agradeço aos meus colegas fiscais sanitários do RS pelas coletas de amostras desta pesquisa, pois sem eles este trabalho não seria possível.

Quero agradecer às colegas do Laboratório de Microbiologia do ICTA por me ensinarem muitas coisas, especialmente a Patrícia, pelo auxílio na parte prática da pesquisa.

A Cheila pelos ensinamentos de microbiologia e pelo auxílio desde início da pesquisa.

A Márcia por estar sempre pronta em ajudar e pelos ensinamentos práticos de microbiologia no final da pesquisa quando mais precisei.

Aos professores do programa de pós-graduação do ICTA/UFRGS pela competência e pelos ensinamentos.

A minha querida professora, Carolina Paz pelos ensinamentos de inglês.

Agradeço também a Marta Rivas, Isabel Chinen e equipe do Serviço de Fisiopatogenia INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán" pela colaboração prestada.

Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Autor: Josete Baialardi Silveira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

RESUMO

As *Escherichia (E.) coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC) compõem um dos mais importantes grupos de patógenos alimentares do mundo. Dentre as STEC, a *E. coli* O157:H7 tem sido a mais amplamente estudada, uma vez que pode causar diarreia sanguinolenta, anemia hemolítica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP), sendo que a carne bovina tem sido um dos principais veículos desse microrganismo. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *E. coli* O157:H7 em amostras de carne moída coletadas no Estado do Rio Grande do Sul (RS), sul do Brasil. Para tanto, 95 amostras de carne moída foram coletadas em diferentes municípios do RS. Dentre essas amostras, três isolados foram identificadas como prováveis *E. coli* O157:H7, segundo os testes recomendados pelo USDA/FSIS. Nesses métodos as cepas cresceram em meio TSB adicionado de novobiocina e casaminoácido, foram positivas para o teste de “screening” utilizando anticorpos específicos, desenvolveram colônias típicas nos meios SMAC (MacConkey sorbitol) e SMAC-CT (Cefixina-telurito), após terem sido submetidas à separação imunomagnética (IMS), aglutinaram o anti-soro para a *E. coli* O157 e não apresentaram atividade de β -glucuronidase. Após a caracterização genotípica por PCR Multiplex, investigando genes de virulência (*rfbO157*, *stx1* e *stx2*), no Laboratório de referência para a vigilância regional de HUS e diarreias sanguinolentas no cone sul, do Ministério da Saúde da Argentina (INEI-ANLIS), os resultados apontaram que os três isolados foram negativos para os fatores de virulência, não produziram Shiga toxinas, não sendo classificados como *E. coli* O157:H7. Cabe ressaltar que a caracterização genotípica dessas cepas dificilmente é realizada em indústrias de alimentos, e mesmo resultados falso-positivos para *E. coli* O157, como os demonstrados nesse trabalho, poderiam afetar significativamente o comércio nacional e internacional de carne bovina brasileira.

Palavras-chave: *Escherichia*, *Escherichia coli* O157: H7, carne bovina moída

Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef samples collected in Rio Grande do Sul State, Brazil

Author: Josete Baialardi Silveira

Advisor: Eduardo Cesar Tondo

ABSTRACT

The Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is one of the most important food pathogen groups worldwide. Among the STEC, *E. coli* O157:H7 has been the most widely studied, once it may cause bloody or nonbloody diarrhea, hemolytic anemia, hemolytic uremic syndrome (HUS), and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), being beef one of the main carriers of this microorganism. The aim of the present study was to investigate the presence of *E. coli* O157:H7 in ground beef samples collected in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil. Thus, 95 ground beef samples were collected in different cities of RS. Among the samples, three isolates were identified as probable *E. coli* O157:H7, according to tests recommended by USDA/FSIS. In these methods, the strains grew in TSB medium added to novobiocine and casamino acid, were positive in the screening test using specific antibodies, developed typical colonies in SMAC (MacConkey sorbitol) and SMAC-CT (Cefixime tellurite) media, after being subjected to Immunomagnetic Separation (IMS), agglutinated the antiserum to *E. coli* O157 and did not show β -glucuronidase activity. After the genotypic characterization by PCR Multiplex, investigating virulence genes (*rfb*O157, *stx1* and *stx2*), at the Reference laboratory for regional surveillance of HUS and bloody diarrheas in the Southern Cone, from the Ministry of Health of Argentina (INEI-ANLIS), the results demonstrated that the three isolates were negative for the virulence factors, did not produce Shiga toxins, not being classified as *E. coli* O157:H7. It is worth mentioning that the genotypic characterization of these strains is hardly performed in food industries, and even false-positive results for *E. coli* O157, as the ones presented in this study, could significantly affect the national and international trade of Brazilian beef.

Keywords: *Escherichia*, *Escherichia coli* O157: H7, ground beef

LISTA DE ABREVIATURAS

DTA – Doença Transmitida por Alimentos

STEC – Shiga toxina produtora de *Escherichia coli*

TTP – Púrpura Trompótica Trombocitopênica

E – *Escherichia*

EaggEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica,

EPEC - *E. coli* enteropatogênica

EHEC – *E. coli* Enterohemorrágica

HUS - Síndrome Urêmica Hemolítica

IAL - Instituto Adolf Lutz

VTEC - *E. coli* verotoxigênicas ou produtoras de verotoxinas

Stx1 – gene Shiga toxina 1

Stx2 – gene Shiga toxina 2

HC - Colite Hemorrágica

EC – Caldo *E. coli*

CNS – Sistema Nervoso Central

SHU – Síndrome Hemolítico-Urêmica

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

FDA - Food and Drug Administration

RS – Rio Grande do Sul

USDA/FSIS – United States Department of Agricultura/Food Safety and Inspection Service

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome

PPGCTA – Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

IMS – Separação imunomagnética

TSBm – Modified tryptone Soy broth

LPS – Lipopolissacarídeo

hly A – Gene enterohemolisina

eae – Gene Intimina

espP - Serina protease extracelular

katP - Catalase-peroxidase

etp - Sistema de secreção tipo II

A/E – Attaching and effacing (ligação/desaparecimento)

fliCH7- Gene flagelar de *E. coli* O157:H7

TTSS - Sistema de secreção tipo III

Foodnet – Foodborne Diseases Active Surveillance Network.

INEI – ANLIS - Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Servicio

Fisiopatogenia Departamento de Bacteriologia “Carlos G. Malbrán”

WHO - World Health Organization

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1.1 INTRODUÇÃO	10
1.2 OBJETIVO GERAL	12
1.2.1. Objetivos específicos	12
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.3.1 Características gerais das <i>Escherichia</i>	13
1.3.2 Características das <i>E. coli</i> produtoras de Toxina Shiga (STEC) e das <i>E. coli</i> enterohemorrágicas (EHEC)	13
1.3.3 Características da <i>Escherichia coli</i> O157: H7	14
1.3.4 Surto de <i>E. coli</i> O157:H7 no mundo	14
1.3.5 Características das Doenças causadas por <i>E. coli</i> O157:H7	15
1.3.6 Fatores de virulência de <i>E. coli</i> O157:H7	17
CAPITULO 2	19
2.1 RESULTADOS	20
CAPITULO 3	36
3.1. Discussão geral	37
4. REFERENCIAS	40
ANEXOS	46

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocorrem após a ingestão de alimentos contaminados por agentes biológicos, físicos e químicos. Apesar dos esforços para o controle dessas doenças, o número de casos de DTA vem aumentando em diferentes partes do mundo (EVES, DERVISI, 2005), inclusive no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Atualmente, as *Escherichia (E.) coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC) compõem um dos mais importantes grupos de patógenos alimentares do mundo. Dentre as STEC, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), do sorotipo O157:H7, tem sido a mais amplamente estudada, uma vez que pode causar severos surtos com diarreia sanguinolenta, anemia hemolítica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) (KARMALI, 1985; KARMALI, 1989; CHINEN et al., 2009; BAM, 2009).

Muitos alimentos têm sido identificados como veículos de *E. coli* O157:H7, contudo produtos elaborados com carne bovina moída têm sido freqüentemente associados aos surtos graves (RILEY et al., 1983).

Embora diversos animais possam ser portadores assintomáticos da *E. coli* O157:H7, os bovinos têm sido identificados como o principal reservatório desse microrganismo, podendo excretá-lo, principalmente, pelas fezes que, por sua vez, podem contaminar o solo, águas de superfícies ou subterrâneas, bem como culturas de hortifrutigranjeiros e produtos de origem animal (CHAPMAN et al., 1993; SHERE et al., 1998; LAEGREID et al., 1999; CAPRIOLI et al., 2005; BEUTIN, 2006). Além disso, a *E. coli* O157:H7 também pode ser disseminada através do contato direto pessoa-pessoa, através da transmissão fecal-oral e pelo contato direto com animais infectados (BELL et al., 1994; RIVAS et al., 2008).

Outro fator que tem contribuído para a ocorrência dos surtos é a reduzida dose infectante da *E. coli* O157:H7, que pode ser menor que 10 células viáveis (FDA, 2008).

As *E. coli* O157:H7, assim como outros sorotipos de STEC, já foram isoladas em mais de 30 países, distribuídos em seis continentes (MEAD; GRIFFIN, 1998). Na Argentina, país que faz divisa com o Estado do Rio

Grande do Sul, Brasil, a *E. coli* O157:H7 tem sido responsável por muitos casos de HUS, tornando essa síndrome uma doença endêmica. Neste país, há um dos índices mais altos do mundo dessa doença, tendo atingido cerca de 12.2 casos a cada 100.000 crianças menores de 5 anos de idade, em 2002 (RIVAS et al., 2006).

No Brasil, até o momento, foram caracterizadas três cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de fezes de pacientes no Estado de São Paulo, pelo Instituto Adolf Lutz (IAL). A primeira cepa foi isolada em 1990, de um paciente com 18 anos de idade com diarreia e que apresentava AIDS. As outras duas cepas foram isoladas de um paciente com 4 anos de idade, do sexo feminino, com diarreia sanguinolenta e de um adulto com diarreia severa, respectivamente. Estes dois últimos pacientes estavam hospitalizados em um hospital de Campinas, São Paulo, em junho e julho de 2001 (IRINO, et. al., 2002). Outro isolado de *E. coli* O157:H7 foi encontrado em uma amostra de fezes bovina coletada no Estado do Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1999). Embora haja o registro desses isolamentos e de diversos casos de HUS no Brasil (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO, 2010), até o momento, não há descrição na bibliografia científica do isolamento da *E. coli* O157:H7 em carne moída ou demais produtos alimentícios, no Brasil.

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *E. coli* O157:H7 em amostras de carne moída coletadas no comércio no Estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil.

1.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de *E. coli* O157:H7 em carne moída no comércio do Estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil.

1.2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar genotipicamente as cepas isoladas quanto à presença de genes de virulência (*rfbO157*, *stx1* e *stx2*).

- Investigar a produção de toxinas shiga nas cepas isoladas através do ensaio de citotoxicidade em células VERO e por anticorpos anti-Stx.

- Comparar os isolados de *E. coli* O157:H7 coletados no Rio Grande do Sul com os isolados do Servicio de Fisiopatogenia - Departamento de Bacteriologia do Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán" - INEI-ANLIS, Ministério da Salud, Argentina.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Características gerais das *Escherichia*

As bactérias do gênero *Escherichia* (*E*) são microrganismos que pertencem à família *Enterobacteriaceae*, assim como as *Salmonella* e *Shigella*. São bastonetes gram-negativos, móveis, não formadores de endósporos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de ácidos e gás em caldo EC, em 24 horas a 44,5° C (JAY, 2005).

A *E. coli* é um habitante normal do trato intestinal dos animais, incluindo os humanos, que exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas (OLSEN, MacKINON, GOULDING, et al., 2000).

Baseados nos sintomas das doenças e nas características sorológicas são reconhecidos cinco grupos de *E. coli* patogênicas, estas são: *E. coli* enteroagregativas (EaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (FDA, 2009; JAY, 2005).

1.3.2 Características das *E. coli* produtoras de Toxina Shiga (STEC) e das *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC)

As *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são também chamadas de *E. coli* verotoxigênicas ou produtoras de verotoxinas (VTEC), uma vez que produzem toxinas similares àquela produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I (FENG, 1995).

As EHEC constituem um subgrupo das STEC que têm sido firmemente associadas à diarreia sanguinolenta e HUS em países industrializados (NATARO; KAPER, 1998).

Mais de 400 sorotipos de STEC foram isolados de bovinos saudáveis (BLANCO et al., 2004), porém, segundo NATARO; KAPER (1998), as *E. coli* EHEC estão freqüentemente implicadas em doenças humanas severas.

O grupo EHEC tem mais de 60 sorotipos que produzem toxinas Shiga, porém de acordo com Karmali (1989), o sorotipo *E. coli* O157:H7 predomina, sendo o mais freqüentemente associado a surtos infecciosos de colite hemorrágica e HUS (FENG, 1995). Isso sugere que essas cepas são mais patogênicas ou mais transmissíveis do que as outras (FORSYTHE, 2002). Mesmo assim, outras EHEC têm sido comumente associadas a doenças humanas, principalmente os sorotipos O26: H11, O103: H2, O111: H8 e O145: H28 (ANON, 1998; GUTH et al., 2002; KARMALI, et al., 2004; EFSA, 2007).

1.3.3 Características da Escherichia coli O157: H7

As principais características que distinguem a *E. coli* O157:H7 dos demais sorovares de *E. coli* são o crescimento pobre ou nulo a 44° C, a temperatura máxima de crescimento em caldo EC de aproximadamente 42° C, a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima β -glucuronidase, além de tolerar menores concentrações de sais biliares (JAY, 2005).

A dose infectante da *E. coli* O157:H7 é ainda desconhecida, mas através de surtos investigados nos Estados Unidos, acredita-se que seja tão baixa quanto à da *Shigella*, ou seja, menos que 10 organismos por grama de alimento consumido (FDA, 2008).

O bovino tem sido identificado como o principal reservatório de *E. coli* O157:H7, uma vez que pode excretar o patógeno pelas fezes e assim contaminar alimentos, água e ambientes (CHAPMAN et al., 1993, LAEGREID et al., 1999, SHERE et al., 1998).

A *E. coli* O157:H7 também pode ser disseminada através do contato direto pessoa-pessoa, através da transmissão fecal-oral e pelo contato direto com bovinos (BELL et al., 1994; RIVAS et al., 2008).

1.3.4 Surtos de E. coli O157:H7 no mundo

A primeira vez que a *E. coli* O157:H7 foi implicada em um surto de origem alimentar foi em 1982, quando pessoas ingeriram sanduíches com

carne de gado, moída, mal cozida em um restaurante *fast food* (RILLEY, et al, 1983).

Em 1993, esse patógeno foi responsável por um grande surto envolvendo mais de 700 pessoas de quatro estados norte americanos, com 51 casos de HUS e 4 mortes. O alimento envolvido foi hambúrguer de carne mal cozida preparado em um *fast food* (FENG, 1995), a qual sofreu sérias conseqüências em decorrência desse surto.

Também em 1993 foi investigado nos Estados Unidos um surto envolvendo 199 pessoas infectadas com *E.coli* O157:H7, envolvendo 26 estados americanos. Nesse surto, 102 pessoas foram hospitalizadas, 31 pessoas tiveram HUS e 3 pessoas morreram. O alimento incriminado foi espinafre fresco (CDC, 2006).

Em 1997, também nos Estados Unidos, ocorreram dois surtos provocados pelo consumo de brotos de alfafa, nos estados de Michigan e Virgínia, envolvendo 60 e 48 pessoas, respectivamente (BREUER, et al., 2001). No primeiro desses surtos, dois casos de HUS foram identificados.

Somente nos Estados Unidos foram estimados aproximadamente 100.000 casos de doenças, 3000 hospitalizações e 90 mortes causados pelas STEC, em 1999. Muitos casos de infecções ocasionadas pelas STEC, nos Estados Unidos, são causados pela *E. coli* O157:H7, com uma estimativa de 73.000 casos ocorridos a cada ano. As STEC não O157 também são importantes causas de doenças diarréicas nos Estados Unidos (FOODNET, 2009).

1.3.5 Características das Doenças causadas por *E. coli* O157:H7

A colite hemorrágica (HC) é nome da doença transmitida pela *E. coli* O157:H7 que pode variar desde infecções moderadas até severas, resultando em morte. Pode ser diagnosticada pelo isolamento da *E. coli* O157:H7 ou verotoxinas produzidas pela *E. coli* a partir de amostras fecais de pacientes com diarréia sanguinolenta. A confirmação também pode ser obtida através do isolamento deste sorotipo em alimentos incriminados (FDA, 2009).

A HC é caracterizada por severas dores abdominais e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta. O período de incubação normalmente é de 3 a 4 dias, podendo variar de 5 a 8 dias ou ser bastante curto como 1 a 2 dias, em alguns casos. A reclamação inicial normalmente é diarreia precedida de dor abdominal e febre baixa. Vômitos acontecem na metade dos pacientes durante o período de diarreia sem sangue e/ou em outros tempos durante a doença. Dentro de 1 ou 2 dias, a diarreia fica sanguinolenta e aumentam as dores abdominais. Esta fase normalmente dura de 4 a 10 dias. Nos casos mais sérios, amostras fecais são descritas como compostas de “apenas sangue e nada de fezes”. Na maioria dos pacientes, a diarreia sanguinolenta termina sem seqüelas, mas em aproximadamente 10% dos casos a doença progride para HUS e complicações subseqüentes. Os sorotipos mais virulentos estão associados a surtos epidêmicos e a enfermidades severas que consistem em uma microangiopatia trombótica. Sua severidade varia de doença moderada, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal, até uma desordem mais severa como anormalidades neurológicas e falha renal, às vezes resultando em morte. Na HUS o paciente sofre de diarreia sanguinolenta, anemia hemolítica e falha renal aguda. Os trombos fibrinoplaquetários se depositam predominantemente na circulação renal, o que requer diálises e transfusões de sangue. A maioria dos pacientes recupera-se com terapias apropriadas, mas de 3 a 5% das crianças vão a óbito e aproximadamente 12 a 30% têm seqüelas severas que incluem falha renal grave, hipertensão e/ou manifestações no sistema nervoso central (NATARO; KAPER, 1998; FORSYTHE, 2002). A HUS é mais freqüentemente associada a crianças menores de 5 anos de idade. O impacto é de 2 a 3 casos por 100.000 habitantes na América do Norte e na Europa. Em 85% dos casos a doença ocorre depois de um episódio de gastroenterite causada por *E. coli* produtora de verotoxina, contudo outros microrganismos podem causar a HUS (GEARY et al., 2007). A *E. coli* O157:H7 é responsável por 70% casos, mas demais sorotipos de *E. coli* também foram associados com casos de HUS, como sorotipo O11 e O103 (COPPO, 2005).

Na Argentina a HUS é uma doença endêmica, tendo um dos índices globais mais altos, aproximadamente, 10.4 e 12.2/100.000 casos em crianças

menores de 5 anos de idade, em 2000 e 2001, respectivamente (RIVAS et al., 2006).

No Brasil, foram caracterizadas três cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de fezes de pacientes no estado de São Paulo pelo Instituto Adolf Lutz (IAL). A primeira cepa foi isolada em 1990, de um paciente com 18 anos de idade com diarreia e que estava com AIDS. As outras duas, foram isoladas de um paciente com 4 anos de idade do sexo feminino com diarreia sanguinolenta e de um adulto com diarreia severa. Ambos os pacientes estavam hospitalizados em um hospital de Campinas, São Paulo, em junho e julho de 2001 respectivamente (IRINO, et. al., 2002).

Outro isolado de *E. coli* O157:H7 foi encontrado em amostras fecais de bovinos coletadas no Estado do Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1999). Embora haja o registro desses isolamentos e de diversos casos de HUS (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO, 2010), esses dados sugerem a baixa prevalência desse patógeno em gado leiteiro e de corte no Brasil (CERQUEIRA, et al., 1999). Contudo, outras cepas de STEC não O157 que causam HUS foram associadas com infecções em humanos (GUTH et al., 2000; IRINO et al., 2000; CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al., 2002). Porém até o momento, não há descrição na bibliografia científica do isolamento da *E. coli* O157:H7 em carne moída ou de outros alimentos no Brasil.

1.3.6 Fatores de virulência de *E. coli* O157:H7

As toxinas Shiga produzidas pelas cepas de STEC e EHEC são proteínas designadas como Stx1, Stx2 e variantes. Elas são o produto dos genes *stx1* e *stx2*, segundo técnicas de biologia molecular (PATON; PATON, 1998; NATARO; KAPER, 1998).

O grupo Stx1 é bastante homogêneo, e até o momento foi identificado somente a variante Stx1c associada principalmente a ovinos (ZHANG et al., 2002), porém esta variante também foi detectada em combinação com Stx2d em isolados de origem clínica e de casos menos severos de diarreia (BEUTIN, et al., 2004). Para Stx2 há as variantes *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f* e *Stx2g*

(MARQUES et al., 1987; TYLER et al., 1991; PIERARD et al., 1998; SCHMIDT et al., 2000; LEUNG et al., 2003).

O plasmídeo pO157 contém diversos genes que codificam os seguintes fatores de virulência: *espP* (serina protease extracelular), *katP* (catalase-peroxidase), *hlyA* (enterohemolisina) (SCHMIDT, BEUTIN, KARCH, 1995), *etp* (sistema de secreção tipo II) e uma fímbria que pode estar envolvida na colonização inicial do enterócito, a intimina, codificada pelo gene *eae* (KAPER et al., 1998; SCHMIDT et al., 2000). A capacidade de produzir lesão do tipo “Ligação/Desaparecimento” (A/E) requer a proteína intimina, de 94kDa, codificada por genes do DNA cromossomal. A intimina é responsável pela união da bactéria ao enterócito e pela desorganização das microvilosidades com produção da lesão A/E. A formação da lesão A/E está associada com drástico desordenamento do citoesqueleto da célula do hospedeiro, resultando na produção de uma estrutura com forma de pedestal, rica em actina polimerizada (NATARO; KAPER, 1998; JAY, 2005; CRISTANCHO et al., 2008).

A região do LEE (*locus* do desaparecimento do enterócito) codifica também os reguladores transcricionais do sistema de secreção tipo III (TTSS) utilizados no transporte das proteínas efetoras para as células hospedeiras (GARMENDIA et al., 2005). O gene *fliCH7* também tem sido investigado como fator de virulência das STEC, e ele codifica o antígeno flagelar de *E. coli* O157:H7 (GANNON et al., 1997).

CAPITULO 2

2.1 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo são apresentados na forma de artigo científico. O subtítulo deste capítulo corresponde ao artigo formatado de acordo com as orientações da **Revista Food Control**, onde foi submetido para publicação.

2.1.1 Paper Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef samples collected in Rio Grande do Sul State, Brazil

**Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef samples collected
in Rio Grande do Sul State, Brazil**

**Silveira, J. B.², De Paula, C. M. D.¹, Do Amaral, P.H.¹, Chinen, I³, Rivas, M.³
and Tondo, E. C.^{1*}.**

1. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil. Cep. 91501-970, Caixa Postal 15090. Phone (0055) 51 3308-6677.

2. Secretaria da Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Divisão de Vigilância Sanitária, Núcleo de Vigilância de Produtos/Alimentos. Rua Domingos Crescêncio, 132, 6° andar, sala 607, Bairro Santana, Porto Alegre, RS, Brazil Cep. 90650-090 Phone (0055) 51 3901-1128

3. Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Carlos G. Mailbrán” Ministério de Salud. Av. Vélez Sarsfield, 563, (1281) Buenos Aires, Argentina. Tel/Fax: +54-11-4303-1801

* Corresponding author – ICTA/UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP 91501-970, Caixa Postal 15090, Porto Alegre, RS, Brazil.

Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, tondo@ufrgs.br

Abstract

Escherichia (E) coli O157:H7 is one of the most studied food pathogen worldwide, which has been mainly associated to beef. Until this moment, this pathogen has not yet been isolated from food in Brazil, the biggest beef exporter of the world. On the contrary, in Argentina, border of the Brazilian State of Rio Grande do Sul, the *E. coli* O157:H7 has been frequently isolated. The

objective of this study was to investigate the presence of *E. coli* O157:H7 in ground beef samples in the State of Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil. Thus, 95 ground beef samples were collected in different cities of RS and subjected to isolation methods recommended by USDA/FSIS. The suspect isolates were characterized by PCR Multiplex and verotoxin production at the Reference laboratory for the regional surveillance of HUS and bloody diarrheas in the Southern Cone, from the Ministry of Health of Argentina (INEL-ANLIS). The results demonstrated that three isolates were identified as probable *E. coli* O157:H7, according to tests recommended by USDA/FSIS; however, the genotypic characterization did not confirm this identification, once it neither demonstrated the presence of virulence genes *rfb*O157, *stx1* and *stx2*, nor the production of Shiga toxins in Vero Cells. These results are important because the genotypic characterization of these strains is hardly performed in food industries, and even false-positive results for *E. coli* O157, as the ones presented in this study, could significantly affect the national and international trade of Brazilian beef.

Keywords: *Escherichia*, *Escherichia coli* O157:H7, ground beef,

Introduction

Currently, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is one of the most important food pathogen groups worldwide. Among the STEC, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7 has been the most widely studied, once it may cause severe foodborne outbreaks with bloody or nonbloody diarrhea, hemolytic anemia, hemolytic uremic syndrome (HUS), and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) (KARMALI, 1985; KARMALI, 1989; CHINEN et al., 2009; BAM, 2009).

Although several animals can be asymptomatic carriers of *E. coli* O157:H7, bovine has been identified as the main reservoir of this microorganism and can excrete it mainly by its faeces. Bovine faeces can contaminate surface water, groundwater, as well as crops and animal products (CHAPMAN et al. 1993, LAEGREID et al., 1999, SHERE et al., 1998). In

addition, humans can be contaminated with *E. coli* O157:H7 through person-to-person direct contact, through faecal-oral route, and through direct contact with contaminated animals (BELL et al., 1994; RIVAS et al., 2008).

Another factor that has contributed to the occurrence of foodborne outbreaks is the reduced infecting dose of *E. coli* O157:H7 that can be as few as 10 organisms (FDA, 2008).

A variety of food has been identified as vehicle of *E. coli* O157:H7; however ground beef products have been often implicated in severe outbreaks. As an example, it was reported an outbreak occurred in 1992 in a fast-food chain in the United States, in which more than 700 people became ill and four children died after the consumption of undercooked hamburger (FENG, P., 1995).

E. coli O157:H7, as well as other serotypes of STEC, have already been isolated in more than 30 countries, spread in the six continents (MEAD AND GRIFFIN, 1998). In Argentina, border of Rio Grande do Sul, Southernmost State of Brazil, *E. coli* O157:H7 has been responsible for many cases of HUS, turning the syndrome into an endemic disease. In this country, there is one of the highest rates of HUS in the world, reaching about 12.2 cases per 100.000 in children under 5 years in 2001 (RIVAS et al., 2006).

In Brazil, *E. coli* O157:H7 was found in beef stool samples (CERQUEIRA et al., 1999), as well as in human stools (IRINO et al., 2002), and there is register of some cases of HUS by the Centre for the Epidemiological Surveillance of São Paulo (2008); however *E. coli* O157:H7 was not isolated from ground beef or other food products in Brazil.

The aim of the present study was to investigate the presence of *E. coli* O157:H7 in ground beef samples collected in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling

This study was conducted as a result of a collaborative project among Sanitary Surveillance Division of the State of Rio Grande do Sul, Food Science

and Technology Postgraduate Program PPGCTA/UFRGS, and Physiopathogen Service, Department of Bacteriology, “Dr. Carlos G. Malbran” National Institute of Ministry of Health from Argentina.

A total of 95 ground beef samples (100 g) were collected in supermarkets and butcher shops from different cities of the State of Rio Grande do Sul, Brazil, between June and September 2009 (Table 1). Among the samples, 94 of them were of ground beef and one of sausage prepared with seasoned ground beef. Samples were collected by health sanitary inspectors of Rio Grande do Sul. The samples were collected in sterile plastic bags and then transported, under refrigeration, to Food Control and Microbiology laboratory of ICTA/UFRGS, to be analyzed. In the laboratory, the samples were identified and stored under refrigeration below 5° C until the moment of analysis.

2.2 Isolation of *E. coli* O157:H7

Before analysis, two professionals from the Food Control and Microbiology laboratory of ICTA/UFRGS were trained in Physiopathogen Service, Department of Bacteriology, “Dr. Carlos G. Malbran” National Institute of Ministry of Health from Argentina (INEI-ANLIS). Samples were analysed by the methods of USDA/FSIS, according to the procedures described in the Manual de Procedimientos “Deteccion de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR”. The methods are briefly described below:

2.3 Selective enrichment:

Sixty five of each sample were added to 585 ml of modified tryptic soy broth (mTSB) (OXOID, Hampshire, England), supplemented with 0.00117g of novobiocine (INLAB, São Paulo, Brazil) and 5.85g of casamino acid (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) and incubated at 42±1° C, for 18h.

2.4 Screening by Enzyme Immunoassay (EIA):

After incubation, a 1.0 ml aliquot of mTSB was added to 50 µl of additive solution number 10 (ten) of the Enzyme Immunoassay kit (EIA) *Escherichia coli* O157 Visual Immunoassay™ (TECRA®), being homogenized with an automatic pipette and heated for 15 minutes in boiling water. After the temperature reduction, 200 µl of each solution were added to plastic tubes containing specific antibodies for *E. coli* O157. The tubes were incubated at 37° C, for 30 minutes, and then washed 3 times with the washing solution, discarding the liquid by inversion of the plastic recipient. Next, 200 µl of conjugated antibody were added to the plastic tubes and incubated for 30 minutes at 37° C. The tubes were washed 4 times and added to 200 µl of enzymatic substrate, being then incubated at 37° C for 15 minutes. Next, each sample, as well as the positive and negative controls, was read according to the manufacturer instructions.

2.5 Immunomagnetic Separation

Positive samples in EIA test were selected and an aliquot of 1 ml of mTSB broth was added with 20 µl of Immunomagnetic particle solution (Dynabeads® anti *E. coli* O157, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway), in a sterile Eppendorf tube. The sample was stirred for 15 seconds in a magnetic stirrer. The Eppendorf tubes with the samples were put in a Rotor (Quimis, São Paulo, Brazil) at 18 rpm, for 30 minutes at room temperature. After that, the tubes were placed in a particle magnetic concentrator (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway), containing a removable magnet, and stirred by hands for 5 minutes. Next, without the magnet removal, the supernatant was carefully removed, avoiding the detachment of the immunomagnetic particles fixed to the tube wall. After this, the tubes were washed 3 times with 1 ml of buffered saline solution, added of 0.02 % of Tween 20.

The washings were done without the magnet tied up to the support. After the washing, the particles were suspended in 100 µl of PBS 1x solution.

2.6 Isolation of typical colonies in selective media

An aliquot of 50 μ l of PBS 1x solution containing concentrated particles was placed in Petri dishes containing Sorbitol-MacConkey agar (SMAC) and SMAC with Cefixine and Tellurite (SMAC-CT), respectively, and incubated at 37° C for 18-24 hours.

2.7 Serotyping

Typical colonies were submitted to anti-*E. coli* O157 serum (PROBAC do Brasil, São Paulo, Brazil), (SILVA et al., 2001).

2.8 β -Glucuronidase activity and sorbitol fermentation

E. coli O157:H7 differ from the other *E. coli* because those strains do not use sorbitol within 24h and also are β -glucuronidase negative. Based on these characteristics the following tests were done.

E. coli O157:H7 suspect colonies were overnight cultivated in BHI broth at 37° C. After that, 1 ml of the bacterial suspension was added to sterile tubes containing 10 ml of water added with commercial medium containing the substrate MUG (Metil Umbeliferil Glucuronide). The tubes were incubated for 24 hours at 37° C and were analysed under UV light. The development of blue color under UV light indicated β -Glucuronidase positive activity. Sorbitol fermentation was tested cultivating suspect microorganisms on plates of SMAC and SMAC-CT, for 24 hours, and also in phenol red 1 % sorbitol tubes, during 24 hours. Colorless colonies on plates were considered sorbitol negative, while yellow colonies were considered sorbitol positive. Yellow color in tubes indicated sorbitol positive isolates, and pinkish red color indicated sorbitol negative isolates. *E. coli* ATCC 8739 was used as a control.

2.9 Phenotypic and genotypic characterization

Isolates identified as *E. coli* O157:H7 by the methods described above were sent to Physiopathogen Service, Department of Bacteriology of “Dr. Carlos G. Malbran” National Institute (INEI-ANLIS) of Ministry of Health from Argentina for further phenotypic and genotypic characterization by the following methods:

2.10 Multiplex PCR for detecting genes *stx1*, *stx2* and *rfbO157*

Multiplex PCR was carried out through isolated colonies in SMAC selective medium. The screened genes were *stx1*, *stx2* and *rfbO157*. Three pairs of oligonucleotides were used to amplify the genes and they were: *stx1*: GAAGAGTCCGTGGGATTACG; AGCGATGCAGCTATTAATAA, *stx2*: TTAACCACACCCCACCGGGCAGT; GCTCTGGATGCATCTCTGGT and *rfbO157*: CGGACATCCATGTGATATGG; TTGCCTATGTACAGCTAATCC, *E. coli* EDL933 O157:H7 *stx1/stx2* was used as a positive control, and the standard strain *E. coli* ATCC 25922 was used as negative control.

The PCR reaction mix was composed of 50 µl, containing 5 µl of 10X PCR Buffer (Invitrogen Life Technologies, Brazil), 2 µl of 2.5 mM dNTPs mix (Promega, Madison, WI, USA), 1.5 µl of MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0.2 µl of the oligonucleotide pairs *stx2* and *O157* 0.1 nmol/ml (Invitrogen), 1 µl of the oligonucleotide pair *stx1* 0.1 nmol/µl (Invitrogen), 0.2 µl of *Taq* polymerase 5U/ml (Invitrogen), 36.5 µl of sterile 3-times distilled water, and finally 2 µl of template DNA. 50 µl of PCR reaction mix without template DNA were used as a control system. The amplification conditions were 94 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 seconds, 58 °C for 30 seconds and 72 °C for 30 seconds. The final extension was at 72 °C for 2 minutes. 10 ml of a xylene cyanol solution 0.25% and glycerol in 30% of water (Sigma, St Louis, USA) were aggregated to 50 ml of amplified DNA; inoculating 10 ml in an agarose gel (Invitrogen) at 2% in 1X TAE buffer and added with 0.5 µg of Ethidium bromide/ml (Promega). The electrophoretic mobility at 8V/cm was carried out for 50 minutes. Molecular weight markers 100 bp Molecular Rule (BioRad, Hercules, CA, USA) and Cienmarker (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina) were used. A transilluminator 2000 (BioRad) and a Kodak Digital Science DC 120 system (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) were used to register the gels. The gel analysis was done according to the Kodak Digital Science 1D™ program (Eastman Kodak Company) (LEOTTA, et al., 2005).

2.11. Cytotoxicity Assay in Vero Cells

2.11.1 Sample Preparation

The *E. coli* strains were inoculated in test tubes with 30 ml of capacity containing 10 ml of Penassay broth (Médio de Antibiótico nº 3, Difco). Next, they were incubated at 37° C for 18 hours without agitation. Next, 1 ml of the cultivation was transferred to an 125 ml Erlenmeyer, containing 25 ml of Penassay broth. It was cultivated again, with 140 rpm agitation. The cultivate was centrifuged in 50 ml tubes at 8.000 rpm at 4° C, during 10 minutes. 5 ml of the supernatant was separated in a sterile tube. This sample was identified as supernatant and was poured into cell pellet in a centrifuge tube, resuspending the pellet in 1 ml of PBS 1X. After, the suspension was transferred to an Eppendorf tube and centrifuged at 10.000 rpm at room temperature for 2 minutes. After, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 ml of PBS 1X. It was centrifuged again, being this last procedure repeated twice. After that, the supernatant from the third washing was discarded and the pellet was resuspended in 1 ml of Polymyxin B sulfate solution in PBS (0.1 mg/ml). After, the suspension was passed to a 16-ml centrifuge tube and 2 ml of Polymyxin B sulfate solution in PBS (0.1 mg/ml) was added. After that, it was incubated at 37° C, for 30 minutes, with agitation. It was centrifuged at 10.000 rpm, at 4° C for 2 minutes. Next, 5 ml of the supernatant was stored in a sterile tube. The supernatant and pellet were filtered with 0.22 µm filter and stored at 20° C until the cytotoxicity assay (KARMALI, et al., 1985).

2.11.2 Cytotoxicity Assays

Monolayer Vero cells was observed in the inverted optical microscope. 25 and 50 µl of the each supernatant and each pellet were added to LMC 1, LMC 3 and LMC 9 and one of the reference strains was also tested in duplicate. Thereafter, the microtiter plate was incubated at 37°C in an incubator with 5% of CO₂. Readings were taken daily, observing the microtiter plate in the microscope. The microtiter plate content was discarded after 72 hours of incubation in a recipient with lavender. Cell stain was carried out using 0.75% crystal Violet in 40 % methanol, allowing confirming characteristic cytotoxic effect produced by *Stx* (KARMALI, 1989).

3. RESULTS

Ninety five samples were analyzed, being 94 of ground beef and one of ground beef sausage, collected from different cities of the State of Estado do Rio Grande do Sul, Southern Brazil (Table 1). Among these samples, 3 (three) *E. coli* were identified as probable *E. coli* O157, according to tests recommended by USDA/FSIS. In these methods, the strains grew in TSBm medium added to novobiocine and casamino acid, were positive in the screening test with antibodies for *E. coli* O157 (*Escherichia coli* O157 Visual Immunoassaytm - TECRA®), developed typical colonies in SMAC (MacConkey sorbitol) and SMAC-CT (Cefixime tellurite) media, after being subjected to Immunomagnetic Separation (IMS), did not show β -glucoronidase activity, did not ferment sorbitol and agglutinated the antiserum to *E. coli* O157 (Table 2).

TABLE 1. Place of origin of the ground beef samples collected in different cities of the State of Rio Grande do Sul from June to September 2009

Cities of Origin of samples	Number of collected samples
Porto Alegre	25
Canoas	5
Viamão	8
Caxias do Sul	1
Roca Sales	1
Três Cachoeiras	9
Pelotas	5
Uruguaiana	5
Alegrete	20
Santa Maria	8
Alvorada	1
Morrinhos do Sul	2
Dom Pedrito	5
Total	95

3.1 Genotypic Characterization

Next, the samples were sent to Physiopathogen Service - Department of Bacteriology of “Dr. Carlos G. Malbran” National Institute (INEI-ANLIS) in Buenos Aires, Argentina, which is the reference institute in the study of *E. coli* enterohaemorrhagic in Latin America and the Caribbean, according to Pan American Health Organization (PAHO), associated to the World Health Organization (WHO). The results of PCR Multiplex pointed out that the three

isolates were negative to the virulence factors Stx1, Stx2 (Shiga toxins) and to the gene *rfbO157*, related to LPS (lipopolysaccharide) specific to *E. coli* O157. Besides that, the three isolates were negative to shiga toxin in the cytotoxicity assays in VERO cells. These results demonstrated that the isolates were not classified as *E. coli* O157:H7, even been positive in the methods previously performed and recommended by USDA/FSIS.

TABLE 2. Identification tests carried out in suspected *E. coli* O157:H7 collected in different cities of the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

Origin of Samples	Identification of Samples	TECRA <i>E. coli</i> O157 test	Typical colony in SMAC and SMAC-CT	Sorbitol Degradation	MUG Degradation	Serology for <i>E. coli</i> O157	Gene stx 1	Gene stx 2	Gene <i>rfbO157</i>	VERO Cells
Ground beef	LMC 1	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ground beef	LMC 3	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Sausage	LMC 9	+	+	-	-	+	-	-	-	-

4. DISCUSSION

According to phenotypic methods of isolation done in this study, which were considered the incubation in selective modified TSB medium (mTSB), screening with the Kit TECRA *E. coli* O157, IMS, development of typical colonies on selective media (SMAC and SMAC-CT), β -glucuronidase activity, sorbitol degradation, and serology for *E. coli* O157, the three isolates were identified as *E. coli* O157 (Table 2). However, the genotypic tests did not confirm this identification. These results are of great relevance, once those isolates probably would be considered false-positive microorganisms in food industries, which usually do not perform genotypic tests to identify *E. coli* O157:H7. Such false-positive results could be responsible for taking drastic corrective actions or even for interrupting meat trade, including the export of meat products. Considering that Brazil is the biggest exporter of beef worldwide, these results could have huge economic impact in the Brazilian economy.

Silveira et al. (1999) investigated the occurrence of *E. coli* O157:H7 in 886 hamburger samples in the Southern and Southeastern Brazil between January and September 1997. The pathogen was not found in any of the

analyzed samples, but 17 strains of *E. coli* with positive agglutination in antiserum O157 were isolated. These strains present positive sorbitol fermentation and did not produce verotoxins.

In the research of Silva et al. (2001) involving 340 samples of meat products and slaughterhouse industrial environments in the Southern and Southeastern Brazil, from April 1998 to April 1999, the presence of *E. coli* O157:H7 was not verified as well.

In Argentina, between May 2004 and April 2005, there were analyzed 107 samples of beef carcass and 66 samples of ground beef ready to be sold to consumers in different establishments in the cities of Resistencia and Corrientes. There were biochemically identified as *Escherichia* 39 isolates of beef carcass and 36 of ground beef samples, which were submitted to Multiplex PCR for the genes *stx1*, *stx2*, *rfbO157* and PCR for enterohemolysin (*hlyA*) and intimin (*eae*). From the 75 isolated microorganisms, only one strain (1.3%) was identified as STEC non O157 (CICUTA et al., 2006).

Nowadays, although most studies are directed to the detection of *E. coli* O157 in Brazil, researches related to the detection of non *E. coli* O157 are increasing. As an example, one can quote the study carried out in the State of São Paulo, where the characteristics and the prevalence of STEC strains in 250 samples of raw ground beef were analyzed. 114 samples were collected in the city of Ribeirão Preto and 136 samples in the city of Campinas, from March to December 2002. STEC were isolated in 4 samples (3.5%) collected in Ribeirão Preto, belonging to serotypes O93:H19, ONT: HNT, ONT: H7 and O174: HNT and the collections in Campinas were negative to STEC (BERGAMINI et al., 2007).

In contrast, *E. coli* O157:H7 has been identified in many countries from animal faecal samples, humans and food. As example, one may cite some studies, confirming the presence of this pathogen in ground beef, water, *morcilla* (typical Argentinean sausage) and beef carcass, which are described below.

In the study carried out in Turkey, from October to April 2004, a total of 126 ground beef samples were analyzed to determine the incidence of *E. coli* O157:H7. From the 126 collected samples, only one sample was positive to this pathogen and five were positive to serotype O157 (ELMALI et al., 2005). In

August 1999, an water borne outbreak was registered in the State of New York, USA, involving *E. coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni*, after a fair. Clinical samples were collected from 128 of the 775 patients with diarrhea. However, only one case was confirmed with *E. coli* O157:H7 and another with *Campylobacter jejuni* (BOPP et al., 2003).

Between October 2001 and October 2002, a study was conducted to determine the microbiological quality of 100 samples of *morcillas*, typical Argentinean sausage, and to investigate the presence of Shiga toxin producing *E. coli* (STEC), in Argentina. Results pointed out the presence of *Enterobacteriaceae* in 100 % of the samples and 81 % of faecal coliforms, indicating the inadequate application of heat treatment and inadequate conditions of hygiene during production. STEC were isolated in three samples (3 %) and two (2 %) were characterized as *E. coli* O157:H7 (OTEIZA, et al., 2006). In Guadalajara, Mexico, in 2006, during 12 months, the presence of STEC was investigated in 258 beef carcass samples from a slaughterhouse. The results point out that 53 samples (20.5 %) were positive to *E. coli* non O157, 13 samples (5 %) were positive to *E. coli* O157:NM and 7 (2.7 %) of samples presented positive results to *E. coli* O157:H7 (VARELA-HERNÁNDEZ et al., 2007).

The results demonstrated in the present work corroborate the results of other brazillian studies, which reported that, *E. coli* O157:H7 was not isolated in food samples in Brazil. However, according to the Surveillance Epidemiological Center of São Paulo city, 89 cases of HUS were confirmed and 39 people died in the period of 1997 to 2007, in Brazil. Based on this further studies must be carried out to monitoring the incidence of this important food pathogen, in Brazil.

Acknowledgements

We would like to thank to the health sanitary inspectors of the State of Rio Grande do Sul and other professionals who collaborated with this project in the sample collection.

5. REFERENCES

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL – BAM, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4. Peter Feng, Stephen D. Weagant. Revised: 2009-July <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm> Acesso: 20 de janeiro de 2010

BELL, B.P., M. GOLDOFT, P.M. GRIFFIN, M.A. DAVIS, D.C. GORDON, P.I. TARR, C.A. BARTLESON, J.H. LEWIS, T.J. BARRETT AND J.G. WELLS. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. **The Washington experience, JAMA** **272**, pp. 1349–1353. 1994.

BERGAMINI, A.M.M., SIMÕES, M., IRINO, K., GOMES, T.A.T AND GUTH, B.E.C. Prevalence And Characteristics Of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (Stec) Strains In Ground Beef In São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** **38**: 553-556, 2007.

BOPP, D.J., SAUDERS, B. D., WARING, A. L., ACKELSBERG, J., DUMAS, N., BRAUN-HOWLAND, E., DZIEWULSKI, D., WALLACE, B. J., KELLY, M., HALSE, T., MUSSER K. A., SMITH, P. F., MORSE, D. L., AND LIMBERGER, R. J. Detection, Isolation, and Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157: H7 and *Campylobacter jejuni*. Associated with a Large Waterborne Outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, January, p. 174-180, Vol. 41, No. 1, 2003.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE Série histórica das doenças de transmissão hídrica e alimentar – Síndrome hemolítico-Urêmica e *E.coli* O157: H7. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/IFNET9807_SHU.xls Acesso em: 02 de fevereiro de 2010.

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

CHAMPMAN, P.A., WRIGHT, P. NORMAN, FOX, J., CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 infections in man. **Epidemiology Infection**, **111**: 439-447, 1993.

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** **132** 167-171, 2009.

CICUTA, M.E., DEZA, N., ROIBÓN, W.R., PEREYRA, D., BENITEZ, M.C., ARZÚ, R.O., BOEHRINGER, S.I. Detection of Shiga-toxin producing

Escherichia coli from bovine and ground beef of Corrientes, Argentina. **Rev.Vet.** 17:1, 20 –25, 2006.

ELMALI, M., ULUKANLI, Z., YAMAN, H, TUZCU, M, GENCTAV, K AND CAVLI, P. A Seven Month Survey for the Detection of *E. coli* O157:H7 from Ground Beef Samples in the Markets of Turkey. **Pakistan Journal of Nutrition** 4: (3): 158-161, 2005.

FENG, P., *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. U.S. **Food and Drug Administration**, Washington, D.C., USA, EID Volume 1, Number 2 April-June; 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – Escherichia coli** O157: H7. Disponível em <http://vm.cfsan.fda.gov/%7Emow/chap15.html>. Acesso em: 18 de maio de 2008.

IRINO, K., VAZ, T.M.I., KATO, M.A.M.F., NAVES, Z.V.F., LARA, R.R., MARCO, M.E.C., ROCHA, M.M.M., MOREIRA, T.P., GOMES, T.A.T. AND GUTH, B.E.C. O157:H7 ShigaToxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect Dis.** Abril; 8(4): 446-447, 2002.

KARMALI, M.A., PETRIC, M. LIM, C., CHEUNG, R. ARBUS, G.S. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. **J.Clin. Microbiol.** 22: 614-9, 1985.

KARMALI, M.A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 2: 15-37, 1989.

LAEGREID, W.W., ELDER, R.O., KEEN, J.E. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. **Epidemiology Infection**, 123:291-298, 1999.

LEOTTA, G.A., CHINEN, I., EPSZTEYN, S., MILIWEBSKY, E., MELAMED, I.C., MOTTER, M., FERRER, M., MAREY, E., RIVAS M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga **Revista Argentina de Microbiología** 37: 1-10, 2005.

MEAD, P.S., AND GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet** 352:1207-1212, 1998.

OTEIZA, J.M., CHINEN, I., MILIWEBSKY, E., RIVAS, M. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). **Food Microbiology** 23, 283-288, 2006.

RIVAS M., MILIWEBSKY, E.S., CHINEN, I., DEZA, N., LEOTTA, G.A. Síndrome urémico hemolítico: asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Medicina** (B Aires), 66 (supl. III): 27–32, 2006.

RIVAS, M., SOSA ESTANI S., RANGEL, J., CALETTI, M.G., VALLÉS, P., ROLDÁN, C. D., BALBI, L., MARSANO DE MOLLAR, M.C., AMOEDO, D., MILIWEBSKY, E., CHINEN, I., HOEKSTRA, R.M., MEAD, P., GRIFFIN, P.M. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 14, No. 5, 763, May, 2008.

SHERE, J.A., BARTLETT, K.J., KASPER, C.W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farm in Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiology**, 64:1390-1399, 1998.

SILVA, N., SILVEIRA, N.F.A., CONTRERAS, C., BERAQUET, N.J. Ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciênc Tecnol Aliment.** 21: 223-227, 2001.

SILVEIRA, N.F.A, SILVA, N, CONTRERAS, C., MIYAGUSKU, L., BACCIN, M.D.F., KOONO, E., BERAQUET, N.J. Occurrence of *Escherichia coli*: H7 in hamburgers produced in Brazil. **J Food Prot.** 62:1333-1335, 1999.

VARELA- HERNÁNDEZ, J.J., CABRERA-DIAZ, E., CARDONA-LÓPEZ, M.A., IBARRA-VELÁZQUEZ, L.M., RANGEL-VILLALOBOS, H., CASTILLO, A., TORRES-VITELA, M.R., RAMÍREZ-ÁLVAREZ, A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. **International Journal of Food Microbiology** 113: 237-241, 2007.

CAPITULO 3

3.1. Discussão geral

As *E. coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC) compõem um dos mais importantes grupos de patógenos alimentares do mundo. Dentre as STEC, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), do sorotipo O157:H7, tem sido a mais amplamente estudada, uma vez que pode causar severos surtos com diarreia sanguinolenta, anemia hemolítica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) (KARMALI, 1985; KARMALI, 1989; CHINEN et al., 2009; BAM, 2009).

A partir da primeira notificação da infecção pela *E. coli* O157:H7, em 1982, houve um aumento significativo do número de casos de infecções identificadas nos Estados Unidos e em outros países, tornando esse patógeno um dos principais microrganismos de interesse da microbiologia de alimentos em nível mundial. Como consequência desse aumento, também houve uma melhora expressiva nos sistemas de vigilância das enfermidades associadas à *E. coli* O157:H7 e dos métodos de detecção, levando paralelamente a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) a promover estratégias de prevenção e controle para esse patógeno.

O Codex Alimentarius (2005) elaborou um programa de normas e diretrizes para aplicação dos princípios gerais de higiene dos alimentos, a fim de prevenir as *E. coli* enterohemorrágicas em carne bovina moída e embutidos fermentados. Esse Código de Práticas foi elaborado na Argentina com o auxílio de profissionais dos Estados Unidos, Alemanha, Áustria, Canadá, China, França, Japão, Países Baixos e União Européia e foi dirigido para auxiliar os governos, assim como as indústrias de alimentos a prevenirem surtos alimentares por *E. coli* enterohemorrágicas. O Ministério da Saúde, assim como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, elaboram suas legislações como base nas recomendações e orientações do Codex Alimentarius, contudo, como no Brasil, de acordo com a bibliografia científica, a *E. coli* O157:H7 ainda não foi isolada de alimentos, não há nenhum regulamento oficial para a prevenção específica da *E. coli* O157:H7. Mesmo assim, as indústrias exportadoras, principalmente de carne de bovinos, devem estar de acordo com normas de controle e prevenção internacionais, principalmente porque o Brasil atualmente é o maior exportador de carne

bovina no mundo. Por essa razão, algumas empresas de carne já começaram a investigar a *E. coli* O157:H7, como controle interno.

Os Estados Unidos também são considerados um dos principais exportadores de carne bovina em nível mundial, contudo as infecções por *E. coli* O157:H7 continuam sendo um problema de saúde pública nesse país, apesar dos esforços do governo na implementação de sistemas de vigilância de patógenos associados a surtos alimentares. A incidência de infecções por *E. coli* O157:H7, nos Estados Unidos, foi de 2,1 casos/100.000 habitantes, representando a segunda maior causa de hospitalizações devido a patógenos alimentares. Segundo RIVAS et al. (2008), em 2002, a Argentina foi o país com a maior taxa global de HUS, atingindo índices de 12,2 casos/100.000 de crianças menores de 5 anos. Em virtude da proximidade desse país com o Brasil e da importância social e econômica da *E. coli* O157:H7, programas de monitoramento de HUS e de *E. coli* O157:H7 deveriam ser implementados em nível nacional. Ressaltando essa necessidade, o Estado de São Paulo, através de seu Sistema de Vigilância Epidemiológica, já notificou 89 casos de HUS e 39 óbitos por essa doença, no período de 1998 a 2007 (CVE, SP, 2010).

E. coli O157:H7 tem sido analisada na Argentina pelo Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI-ANLIS), do Ministério de la Salud. Esse Instituto utiliza a metodologia analítica preconizada pelo USDA/FSIS, dos Estados Unidos, e essa metodologia tem demonstrado ótimos resultados para a identificação da *E. coli* O157:H7. Por essa razão, o presente estudo buscou utilizar o mesmo método para as análises de amostras de carne brasileira. Ao contrário do que recomenda a Instrução Normativa nº 62/2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 2003) que recomenda a investigação de 25g de amostra, o método do USDA/FSIS e INEI-ANLIS preconiza a incubação de 65g de amostra em caldo TSB modificado, aumentando as chances de isolamento do patógeno. Após essa incubação, as amostras passam por um *screening* através de métodos rápidos e reconhecidos, baseados geralmente em ELISA. As amostras positivas nesse *screening* são submetidas à separação imunomagnética com anticorpos para *E. coli* O157, o que parece ser um passo muito importante para o isolamento desse patógeno alimentar. Mesmo que a separação imunomagnética seja recomendada na Instrução Normativa nº 62/2003 do MAPA, nem todas as

poucas instituições de pesquisa e indústrias de alimentos brasileiras que investigam a *E. coli* O157:H7 utilizam a separação imunomagnética, dificultando a detecção da *E. coli* O157:H7 (SILVA et al., 2001; SILVA, et al., 2003).

Cabe ressaltar, que no presente estudo, mesmo utilizando a separação imunomagnética (IMS) e o método preconizado por USDA/FSIS e INEI-ANLIS, não foi possível identificar *E. coli* O157:H7 em amostras de carne moída. Esse resultado só foi alcançado, após a caracterização genotípica no Laboratório de Referência da Argentina (INEI-ANLIS) para a investigação desse patógeno. Os microrganismos isolados foram *E. coli* que produziram colônias semelhantes às de *E. coli* O157:H7, inclusive β -glucuronidase negativas e sorologia positiva para *E. coli* O157. Em vista disso, os resultados do presente trabalho são de grande relevância, uma vez que tais isolados seriam possivelmente considerados como *E. coli* O157:H7 em indústrias de alimentos brasileiras, as quais geralmente não realizam testes genotípicos para identificação de *E. coli* O157:H7. Microrganismos apresentando essas características poderiam ser responsáveis por ações corretivas drásticas, como a rejeição de lotes, ou mesmo prejuízos na comercialização nacional ou internacional de carne bovina brasileira.

4. REFERENCIAS

ANON. Zoonotic Non-0157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), Report of a WHO Scientific Working Group Meeting, Berlin, Germany, 23-26 June; pp. 1-30. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL – BAM, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4. Peter Feng, Stephen D. Weagant. Revised: 2009-July <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm> Acesso: 20 de janeiro de 2010.

BELL, B.P., M. GOLDOFT, P.M. GRIFFIN, M.A. DAVIS, D.C. GORDON, P.I. TARR, C.A. BARTLESON, J.H. LEWIS, T.J. BARRETT AND J.G. WELLS. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. **The Washington Experience, JAMA 272**, pp. 1349–1353. 1994.

BEUTIN, L., KAULFUSS, S., CHEASTY, T., BRANDENBURG, B., ZIMMERMANN, S, GLEIER, K., WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R.. Characteristics and association with disease of two major subclones of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) O157 that are present among isolates from patients in Germany. **Microbiology Infection Disease**, 44: 337–346, 2002.

BREUER T., BENKEL, D. H., SHAPIRO, R. L., HALL, W. N., WINNETT, M. M., LINN, M. J., NEIMANN, J., BARRETT, T. J., DIETRICH, S., DOWNES, F. P., TONEY, D. M., PEARSON, J. L. ROLKA, H., SLUTSKER, L., GRIFFIN, P. M., AND THE INVESTIGATION TEAM. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 Infections Linked to Alfalfa Sprouts Grown from Contaminated Seeds. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. Vol. 7, No. 6, November-December 977 **Emerging Infectious Diseases**, 2001.

BLANCO J.E., M. BLANCO, M.P. ALONSO, A. MORA, G. DAHBI, M.A. COIRA, J. BLANCO. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. **Journal Clinical Microbiology**, 42: 311-319, 2004.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.

CANTARELLI, V., NAGAYAMA, K., TAKAHASHI, A., HONDA, T., CAUDURO, P. F., DIAS, C. A.G., MEZZARI, A., BRODT, T. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (Stec) Serotype O91:H21 from A Child with Diarrhea in Porto Alegre City, Rs, Brazil **Brazilian Journal of Microbiology** (31:266-270, 2000.

CAPRIOLI, A., MORABITO, S., BRUGERE, H AND OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli*: Emerging, issues on virulence and modes of transmission. **Vet Res** 36, 289-311, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Ongoing Multistate of *Escherichia coli* serotype O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach. United States. **MMWR**; Morb Mortal Wkly Dispatch Setember 26, 55: 1-2, 2006.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – **CVE** Série histórica das doenças de transmissão hídrica e alimentar – Síndrome hemolítico-Urêmica e *E.coli* O157: H7. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/IFNET9807_SHU.xls Acesso em: 02 de fevereiro de 2010.

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

CHAMPMAN, P.A., WRIGHT, P. NORMAN, FOX, J., CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 infections in man. **Epidemiology Infection**, 111: 439-447 1993.

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** 132 167-171, 2009.

COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex sobre higiene de los alimentos documento de debate sobre las directrices para la aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos para el control basado en el riesgo de *escherichia coli* enterohemorrágica. EN Tema 11 del programa CX/FH 05/37/11 Trigésima séptima reunión; Buenos Aires, Argentina, del 14 al 19 de marzo de 2005.

COPPO, P., VERNANT, J.P., VEYRADIER, A., FRÉMEAUX-BACCHI, V., MIRA, J.P., GUIDET, B., AZOULAY, E., RONDEAU, E., BUSSEL, A. pour le Réseau d'étude des microangiopathies thrombotiques de l'adulte Purpura thrombotique thrombocytopenique **EMC-Hématologie** 2, 14–34, 2005.

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

EFSA. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic types. **EFSA J** 579, 1-61, 2007.

EVES, A., DERVISI, P. Experiences of the implementation and operation of hazard analysis critical control points in the food service sector. **Hospitality Management**, 24: 3-19, 2005.

FENG, P., *Escherichia coli* Serotype O157: H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. U.S. **Food and Drug Administration**, Washington, D.C., USA, EID Volume 1, Number 2 April-June; 1995

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological analytical manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, Revised: September, 2002 Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. Acesso em: 18 de maio de 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – *Escherichia coli* O157: H7. Disponível em <http://vm.cfsan.fda.gov/%7Emow/chap15.html>. Acesso em: 18 de maio de 2009.

FOODNET – Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Recommendations for Diagnosis of Shiga Toxin--Producing *Escherichia coli* Infections by Clinical Laboratories October 16: 58(RR12); 1-14, 2009.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 424p, 2002.

GANNON, V. P. J., D'SOUZA, S., GRAHAM, T., KING, R. K., RAHN, K. AND READ, S. Use of the Flagellar H7 Gene as a Target in Multiplex PCR Assays and Improved Specificity in Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, Vol. 35, Nº 3, p. 656–662, Mar., 1997.

GARMENDIA, J., FRANKEL, G., CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun.* 73:2573-2585, 2005.

GEARY, D.F., Hemolytic Uremic Syndrome and *Streptococcus Pneumoniae*: Improving our Understanding. 114 Editorials **The Journal of Pediatrics**, p. 140, 2007.

GUTH, B.E.C., DE SOUZA, R.L., VAZ, T.M.I. AND IRINO, K. First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 8, No. 5, May 2002.

GUTH, B.E.C., RAMOS, S.R.T.S., CERQUEIRA, A.M.F., ANDRADE, J.R.C., GOMES T.A.T. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **4th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin) - producing *Escherichia coli* infections – VTEC 2000.** Kyoto, Japan, p. 149, 2000.

IRINO, K., GOMES, T.A.T., VAZ, T.M.I., KANO, E., KATO, M.A.M.F., DIAS, A.M.G., et al. Prevalence of Shiga toxin and intimin gene sequences among *Escherichia coli* of serogroups O26, O55, O111, O119 and O157 isolated in São Paulo, Brazil. In: **Abstracts of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin) – producing *Escherichia coli* infections.** Kyoto, Japan, p. 107, 2000.

IRINO, K., VAZ, T.M.I., KATO, M.A.M.F., NAVES, Z.V.F., LARA, R.R., MARCO, M.E.C., ROCHA, M.M.M., MOREIRA, T.P., GOMES, T.A.T. AND GUTH, B.E.C. O157:H7 ShigaToxin-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect Dis.** Abril; 8(4): 446-447, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005.

KAPER, J.B., ELLIOTT, S., SPERANDIO, V., PERNA, N.T., MAYHEW, G.F., BLATTNER, F.R., Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. **ASM Press, Washington, DC**, pp. 163–182, 1998.

KARMALI, M.A., PETRIC, M. LIM, C., CHEUNG, R. ARBUS, G.S. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. **J.Clin. Microbiol.** 22: 614-9, 1985.

KARMALI, M.A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 2: 15-37, 1989.

KARMALI, M.A., PETRIC M., LIM C., FLEMING P.C., ARBUS G.S., LIOR H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal Infectious Diseases**, 189(3): 556-63 2004.

LAEGREID, W.W., ELDER, R.O., KEEN, J.E. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in range beef calves at weaning. **Epidemiology Infection**, 123:291-298, 1999.

LEUNG, P.H.M., PEIRINS, J.S.M., NG, W.W.S., ROBINS-BROWNE, R.M., BETTELHEIM, K.A., YAM, W.C. A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. **Appl. Env. Microbiol.** 69: 7549-53, 2003.

MARQUES, L.R.M., PEIRIS, J.S.M., CRYST, S.J., O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. **FEMS Microbiol. Lett.** 44: 33-8, 1987.

MEAD, P.S., AND GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet** 352:1207-1212, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550
Acesso em: 02 de janeiro de 2010.

NATARO J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 142–201, 1998.

OLSEN, S.J., MacKINON, L.C., GOULDING, J.S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, n SS01, p. 1-51, March 17 2000.

OTEIZA, J.M., CHINEN, I., MILIWEBSKY, E., RIVAS, M. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). **Food Microbiology** 23, 283-288, 2006.

PATON, J.C., PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews** 11, 450–479, 1998.

PIERARD, D., MUYLDERMANS, G., MORIAU, L., STEVENS, D., LAUWERS, S. Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3317-3322, 1998.

RILEY, L.W., TEMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. **N Engl J Méd.** 308:681–685, 1983.

RIVAS M., MILIWEBSKY, E.S., CHINEN, I., DEZA, N., LEOTTA, G.A. Síndrome urémico hemolítico: asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Medicina** (B Aires), 66 (suppl. III): 27–32 2006.

RIVAS, M., SOSA-ESTANI S., RANGEL, J., CALETTI, M.G., VALLÉS, P., ROLDÁN, C. D., BALBI, L., MARSANO DE MOLLAR, M.C., AMOEDO, D., MILIWEBSKY, E., CHINEN, I., HOEKSTRA, R.M., MEAD, P., GRIFFIN, P.M. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 14, No. 5, 763, May, 2008.

SCHMIDT, H., SCHEEF, J., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., WIELER, L.H., KARCH, H.A. New Shiga Toxin 2 Variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. **Applied and Environmental Microbiol.** 66: 1205-8, 2000.

SCHMIDT, H., BEUTIN, L., KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity** 63: 1055–1061, 1995.

SHERE, J.A., BARTLETT, K.J., KASPER, C.W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157: H7 dissemination on four dairy farm in Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiology**, 64: 1390-1399, 1998.

SILVA, N., SILVEIRA, N.F.A., CONTRERAS, C., BERAQUET, N.J. Ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 21: 223-227, 2001.

SILVA, N., SILVEIRA, N.F.A., YOKOYA, F., OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 23 (2): 167-173, maio-ago, 2003.

TYLER, S.D., JOHNSON, W.M., LIOR, H., WANG, G., ROZEE, K.R. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and Restriction fragment length polymorphism. **J. Clin. Microbiol.** 29: 1339-43, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva, 1997.

ZHANG, W., BIELASZEWSKA, M., THORSTEN, K., KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from human. **J. Clin. Microbiol.** 40: 1441-6, 2002.

ANEXOS