

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIS DE ERIC-PCR DE *Escherichia coli* E *E. coli* O157:H7 EM
MEIAS-CARCAÇAS BOVINAS**

Joice Vinhal Costa
Orientador(a): Prof. Dr. Iolanda Aparecida Nunes

GOIÂNIA
2008



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações - BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a): Joice Vinhal Costa			
CPF:	E-mail:		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☐ Sim ☐ Não			
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:			Sigla:
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ:
Título: Perfis de ERIC-PCR de <i>Escherichia coli</i> e <i>E. coli</i> 0157: H7 em miúdos de carne bovina			
Palavras-chave: caracterização molecular, carne, patógenos			
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua: molecular characterization, meat, pathogens			
Área de concentração: Higiene e Tecnologia de Alimentos			
Data defesa: (dd/mm/aa)		27/08/2008	
Programa de Pós-Graduação: Ciência Animal			
Orientador(a): Prof. Dr. Iolanda Aparecida Nunes			
CPF:	E-mail:		
Co-orientador(a): Prof. Dr. Cristiano Sales Prado e Prof. Dr. Cíntia Silva Minafra e Rezende			
CPF:	E-mail:		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

- ☐ Capítulos. Especifique: _____
- ☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do(a) autor(a)

Data: 01 / 09 / 2008

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

JOICE VINHAL COSTA

**PERFIS DE ERIC-PCR DE *Escherichia coli* E *E. coli* O157:H7 EM
MEIAS-CARCAÇAS BOVINAS**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador(a):

Prof. Dr. Iolanda Aparecida Nunes

Comitê de orientação

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado

Prof. Dr. Cíntia Silva Minafra e

Rezende

GOIÂNIA

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Costa, Joice Vinhal .
C837p Perfis de ERIC-PCR de *Escherichia coli* e *E. coli* 0157: H7 em
meias-carcaças bovinas [manuscrito] / Joice Vinhal Costa. – 2008.
x, 80f. : il.,figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes; Co-Orientadores: Prof. Dr. Cristiano Sales Prado, Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende .

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia: f. 62-80.

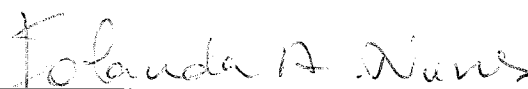
Inclui lista de figuras e de tabelas.

1 *Escherichia coli* – Bovino de corte 2. *E. coli* 0157:H7 – Caracterização molecular 3. Saúde Pública 4. Segurança alimentar
I. Nunes, Iolanda Aparecida. II. Prado Cristiano Sales III. Rezende, Cíntia Silva Minafra e IV. Federal de Goiás, Escola de Veterinária.
V. Título.

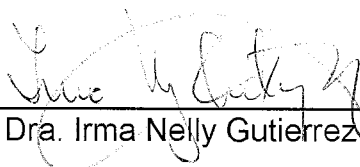
CDU: 636.2:579

JOICE VINHAL COSTA

Dissertação defendida e aprovada em **27/08/2008**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Iolanda Aparecida Nunes
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera - ICBII/USP



Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer diante às dificuldades.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Goiás e à Escola de Veterinária da UFG, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos meus queridos pais, Waldson Caetano da Costa e Jacqueline Barcelos Vinhal Costa, pelo exemplo de amor, apoio e estímulo.

Aos meus queridos irmãos, Nádia, Rafael e Saulo, pelo amor, apoio e incentivo.

À Prof. Dr. Iolanda Aparecida Nunes, pela orientação, incentivo e pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao amigo Leonardo França, pelo auxílio durante todo o trabalho.

Ao Dr. Oyama Rodrigues da Silva e Dr. Keili Maria Cardoso de Souza, pela ajuda com a técnica utilizada e construção do dendrograma.

Às queridas amigas Rejane Ferreira Campos, Aline Diniz Dias, Clarice Marçal Faria, Patrícia de Melo Oliveira e Aguiar, Mariana Ferreira Oliveira, Lorena Dias dos Santos Teles, Letícia da Cunha, Loranne Gomes Magalhães, Alyne Cristina Maculan, Fernanda Pereira da Silva e Karolynne Márcia Siqueira, que acompanharam de perto e de longe o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Lucas Fleury Orsine, pelo amor, compreensão e companheirismo.

Aos colegas de mestrado Camila Silveira de Melo, Marco Antônio Silva e Roberta Menezes.

À Prof. Dr. Geisa Fleury Orsine, pelo carinho e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade Montes Belos, professores, funcionários e alunos do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos pela confiança e credibilidade a mim depositadas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 <i>E. coli</i> e <i>E. coli</i> O157:H7	2
- Características	2
- Grupos de virulência	4
a) <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	4
b) <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	5
c) <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	7
c) <i>E. coli</i> enteroagregativa (EaggEc)	8
e) <i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC)	8
f) <i>E. coli</i> uropatogênica (UPEC)	9
g) <i>E. coli</i> Neonatal causadora de Meningite (NMEC)	9
h) <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	10
2.2 Associação com alimentos	11
- <i>E. coli</i>	11
- <i>E. coli</i> O157:H7	14
2.3 Importância em saúde pública	17
- <i>E. coli</i>	17
- <i>E. coli</i> O157:H7	19
2.4 Papel do bovino na epidemiologia	21
2.5 Tipagem e epidemiologia molecular	25
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Amostragem	34
4.2 ERIC-PCR	35
Extração do DNA	35
Amplificação	35
Reação de PCR	35
4.3 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i>	37

5.2 Perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> O157:H7	44
5.3 Relações genéticas entre as amostras de <i>E. coli</i> e <i>E. coli</i> O157:H7	50
6 DISCUSSÃO	55
6.1 Perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i>	55
6.2 Perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> O157:H7	57
6.3 Relações genéticas	57
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dendrograma obtido pela técnica de ERIC-PCR em cepas de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B. Goiânia, 2008 53
- Figura 2 – Dendrograma obtido pela técnica de ERIC-PCR em cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B. Goiânia, 2008 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas. Goiânia, 2008	40
Tabela 2 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas. Goiânia, 2008	41
Tabela 3 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, segundo o matadouro-frigorífico. Goiânia, 2008	42
Quadro 1 - Perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, nos matadouros-frigoríficos A e B. Goiânia, 2008	43
Tabela 4 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> O157:H7 isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas. Goiânia, 2008	45
Quadro 2 – Identificação das amostras de <i>E. coli</i> e <i>E. coli</i> O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e os perfis de ERIC-PCR obtidas. Goiânia, 2008	46
Quadro 3 – Perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> e <i>E. coli</i> O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas do matadouro-frigorífico B. Goiânia, 2008	48
Quadro 4 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em <i>E. coli</i> O157:H7 de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, segundo o matadouro-frigorífico. Goiânia, 2008	49

RESUMO

São diferentes os sorotipos de *Escherichia coli* responsáveis por distúrbios entéricos, muitas vezes relacionados com o consumo de carne ou alimentos que foram contaminados e não passaram por tratamento térmico eficiente antes de serem ingeridos. No Brasil não há dados sobre possíveis surtos causados por *E. coli* O157:H7, mas este patógeno vem sendo frequentemente encontrado em fezes bovinas e recentemente foi isolado de meias carcaças quentes e resfriadas bovinas destinadas à exportação no Estado de Goiás. O presente trabalho objetivou identificar os perfis de ERIC-PCR em *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de superfícies de meias-carcaças quentes e resfriadas de bovinos de dois matadouros-frigoríficos de Goiás além de verificar a capacidade de discriminação desta metodologia. A técnica de ERIC-PCR foi utilizada na caracterização molecular das 111 amostras analisadas, sendo obtidos 32 perfis distribuídos em 90 cepas de *E. coli* e oito perfis distribuídos em 16 cepas de *E. coli* O157:H7. De um total de 111 amostras, duas cepas de *E. coli* e cinco de *E. coli* O157:H7 eram não-tipáveis. Os perfis de ERIC-PCR de *E. coli* variavam de um a 18 fragmentos. A discriminação entre as cepas de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 pela técnica utilizada foi alta, mostrando a grande capacidade da técnica de ERIC-PCR em discriminar cepas de uma mesma espécie. O índice de discriminação entre *E. coli* e *E. coli* O157:H7 foi de 0,96.

Palavras-chave: caracterização molecular, carne, patógenos

ABSTRACT

There are different serotypes of *Escherichia coli* responsible for enteric disfunctions, and in the most of time those are related with meat consume or contaminated food that had not been cooked with an efficient thermal treatment before been ingested. In Brazil there aren't inform data of possible outbreaks caused by *E. coli* O157:H7, but this pathogen has been frequently isolated from cattle's feces, and it was recently isolated from bovine carcass at two slaughterhouses in Goiás. The present study has the objective to characterize by ERIC-PCR *E. coli* and *E. coli* O157:H7 detected at bovine carcass surfaces and check the power of this methodology to identify different isolates of *E. coli* and *E. coli* O157:H7. ERIC-PCR was used to characterize 111 samples, and it was obtained 32 fingerprints separated in 90 isolates of *E. coli* and eight fingerprints separated in 16 isolates of *E. coli* O157:H7. From the total of 111 samples, two isolates of *E. coli* and five of *E. coli* O157:H7 were non-typables. The fingerprints varies from one to 18 bands. The discrimination between the samples was high, showing the big power of ERIC-PCR to discriminate isolates from one specie. The discriminatory index between *E. coli* and *E. coli* O157:H7 obtained was 0,96.

Key-words: molecular characterization, meat, pathogens

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas foram identificadas novas espécies de microrganismos patogênicos ou verificado o reaparecimento de agentes já conhecidos, mas foram também desenvolvidos métodos mais eficazes de isolamento e detecção. Mudanças demográficas e alterações nos hábitos alimentares têm provocado modificações tecnológicas na indústria com relação à formulação, ao processamento e à distribuição dos alimentos. Essas modificações, associadas à habilidade dos microrganismos de se desenvolverem rapidamente e se adaptarem ao ambiente, têm acarretado novos desafios no sistema alimentar (ROWLANDS et al., 2007).

O isolamento e a identificação de *E. coli* O157:H7 em fezes de bovinos em várias regiões do Brasil devem ser considerados, uma vez que a carne pode ser contaminada nos matadouros-frigoríficos durante a evisceração dos animais, pelo contato com a pele previamente contaminada com fezes ou por contaminação cruzada.

A detecção de *E. coli* O157:H7 em superfície de meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas em matadouros-frigoríficos de grande porte no Estado de Goiás, cuja produção é voltada para o mercado externo, é preocupante e serve de alerta às autoridades sanitárias, quando considerada a gravidade das complicações provocada pela doença.

Além disso, relatos de casos esporádicos de diarreia associados a *E. coli* O157:H7 ocorridos no Brasil mostram a necessidade de uma investigação epidemiológica efetiva, através de técnicas laboratoriais avançadas para caracterização da bactéria, assim como a busca de notificações dos casos pelos médicos, a análise laboratorial dos alimentos ingeridos.

A amplificação de seqüências ERIC é uma técnica de tipagem muito utilizada para estudar a relação clonal em diversas bactérias Gram-negativas. ERIC-PCR tem sido utilizada como uma metodologia de grande capacidade de discriminação entre cepas de *E. coli* na separação entre patogênicas e não-patogênicas, ou agrupando as cepas patogênicas de acordo com a origem da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de *E. coli* e *E. coli* O157:H7

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez no final do século XIX, tendo sido denominada *Bacterium coli commune*. Desde as primeiras pesquisas, ficou clara sua associação com diarreia, particularmente em crianças (GERMANO & GERMANO, 2008).

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e nele são descritas as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, sendo a primeira a de maior importância em saúde pública (TRABULSI et al., 2008).

Anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose, com produção de ácido e gás, a maioria fermenta a lactose, produzindo ácido e gás, são oxidase-negativas, catalase-positivas, Vermelho de Metila positivas, Voges-Proskauer negativas e citrato-negativas, reduzem nitrato a nitrito, não produzem H₂S, urease e/ou lipase, produzem indol. As cepas de *E. coli* são bastonetes Gram-negativos não esporulados, móveis por flagelos peritríquios (BERGEY'S, 1994), ressaltando-se que em um mesmo sorovar pode haver cepas móveis e imóveis, indicando que estas sejam derivadas das móveis por perda mutacional do flagelo.

A maioria das cepas de *E. coli* O157:H7 são móveis, não fermentam o sorbitol (SOR⁻) e são β-glicuronidase negativas (GUD⁻). Entretanto, uma cepa de *E. coli* O157:H7 imóvel, SOR⁺, GUD⁺ foi descrita na Alemanha (KARCH e BIELASZEWSKA, 2001), e outra imóvel, SOR⁻, GUD⁻ na Austrália (ROBINS-BROWNE et al., 1998).

Capazes de crescer em pH de 4,4 a 9,0 com pH ótimo entre 6,5 e 7,5, é conhecida a capacidade de *E. coli* para tolerar ambientes ácidos, o que lhes permite sobreviver no trato gastrointestinal (BERGEY'S, 1994).

As cepas não adaptadas a ambiente ácido sobrevivem em pH de 2,5 até por seis horas (SAINZ et al., 2005). Foi observada a sobrevivência de *E. coli* em produtos ácidos e de alta acidez, como em maionese (RAGHUBEER et

al., 1995), cidra de maçã (ZHAO et al., 1993) e derivados de leite fermentado (AROCHA et al., 1992), assim como a de *E. coli* O157:H7 em suco de cidra de maçã, cujo pH encontra-se entre 3,3 e 4,1 (ZHAO et al., 1993).

Em condições ótimas de crescimento, *E. coli* pode se desenvolver em atividade de água (a_w) de 0,95 (BERGEY'S, 1994), enquanto que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por até oito semanas em a_w de 0,34 (RYU et al., 1999), como ambientes dessecados e salsichas dessecadas e estocadas sob refrigeração (ROWLANDS et al., 2007).

Mesófilas típicas, desenvolvem-se entre 7°C e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento. A 4°C, no entanto, sobrevivem por longos períodos (ANANG et al., 2007). São termolábeis, sendo sensíveis aos tratamentos pasteurizantes e destruídas em poucos segundos quando tratadas a 60°C (BERGEY'S, 1994).

Com relação à temperatura, *E. coli* O157:H7 apresenta crescimento pobre ou nulo a 44°C (SHUTERLAND et al., 1995), diferenciando-se dos outros sorovares da espécie, não sendo possível sua detecção nas análises de coliformes fecais pelo método do Número Mais Provável (NMP), que utiliza a fermentação da lactose a 44,5°C como característica confirmativa (SILVA et al., 2003). Por outro lado, pode sobreviver em temperaturas de congelamento por períodos prolongados (ROWLANDS et al., 2007).

As cepas de *E. coli* diferenciam-se sorologicamente com base nos antígenos de superfície, os antígenos somáticos (O), que são relacionados com polissacarídeos de membrana externa, nos flagelares (H), relacionados a proteínas dos flagelos e nos capsulares (K), relacionados a polissacarídeos capsulares (BERGEY'S, 1994).

São descritos 174 antígenos somáticos "O", 100 capsulares "K" e 57 flagelares "H" (BERGEY'S, 1994). Nem todas as cepas possuem os três tipos de antígenos simultaneamente, observando-se elevado percentual na forma rugosa, que não apresentam antígeno somático "O", enquanto que muitas não possuem antígenos capsulares "K" e outras são imóveis. Essas variações dificultam a identificação sorológica, tornando-a freqüentemente incompleta, tendo por base somente o antígeno somático "O" ou os antígenos "O" e "H" (TRABULSI et al., 2002).

- **Grupos de virulência de *E. coli***

A maioria das cepas de *E. coli* não causa doença, ou até mesmo são benéficas ao intestino, mas alguns sorovares são patogênicos para o homem (CALLAWAY et al., 2004).

Com base nas diferentes síndromes e características da enfermidade causada por *E. coli* patogênica, esses sorovares são classificados nos grupos de virulência enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enteroagregativos (EaggEC) e enterohemorrágicos (EHEC), difusamente aderente (DAEC), *E. coli* neonatal (NMEC) e uropatogênicos (UPEC) (GERMANO & GERMANO, 2008).

a) *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

As cepas EPEC são uma das principais causas de mortalidade causada por diarreia em crianças, em particular nos países em desenvolvimento (CLARKE et al., 2002) e em comunidades de baixa renda, onde ainda estão associados fatores como subnutrição, condições precárias de habitação, falta de água potável e de rede de esgotos (SILVA & SILVA, 2005). Em países desenvolvidos, a diarreia causada por esse grupo é esporádica (MANGIA et al., 2004).

As cepas EPEC colonizam as microvilosidades das células epiteliais intestinais e produzem uma lesão em suas bordas, “fixação e destruição” (A/E) conforme demonstrado por microscopia eletrônica. Além da lesão A/E, outros fatores que colaboram com a patogenicidade de EPEC, como a presença do plasmídeo (*eaf*), responsável pela síntese do fator de aderência EAF, uma proteína de 50 a 70 kDa, que promove um tipo de adesão ao enterócito denominada “adesão localizada” (AL). Esta característica é específica de cepas EPEC, enquanto que nos outros grupos o fator de adesão é difuso (AD) (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Essas cepas são capazes de induzir profundas alterações no citoesqueleto das células epiteliais, com destruição das microvilosidades e

acúmulo de actina no local da adesão, formando um pedestal (SILVA & SILVA, 2005). Este efeito, característico de EPEC, é determinado pela intimina, cuja produção é mediada pelo gene cromossômico *eae*. Não se observa a destruição das microvilosidades quando o gene *eae* está ausente, indicando que estes e os genes *eaf* sejam interdependentes (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

A destruição das microvilosidades intestinais determina perda das propriedades absorptivas das células infectadas, provocando diarreia aquosa, às vezes sanguinolenta. O quadro clínico é acompanhado por febre, cólicas e vômito, sendo necessário acompanhamento médico na maioria dos casos (OLIVA et al., 1997).

A doença causada por EPEC tem período médio de incubação de 36h (17h a 72h) e a remissão dos sintomas ocorre, geralmente, em 24h, podendo variar entre seis horas a três dias. Em recém-nascidos e em bebês com menos de seis meses de idade, a enfermidade pode cursar com um quadro de diarreia prolongada, com mais de 14 dias de duração ou mesmo resultar em morte (GERMANO & GERMANO, 2008).

Os sorovares mais freqüentemente envolvidos em doença são: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34, que integram as EPEC típicas. Dentre as atípicas, O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2. Típicas e atípicas são capazes de causar a lesão A/E, porém o plasmídeo EAF está presente apenas nas EPEC típicas (TRABULSI et al., 2008).

EPEC é transmitida por mãos, objetos ou alimentos contaminados por fezes. A carne de aves, em especial a de frango, tem sido apontada como veículo de surtos de toxinfecção alimentar, principalmente por cepas EPEC (GERMANO & GERMANO, 2008).

b) *E.coli* enterotoxigênica (ETEC)

As cepas deste grupo são importante causa de diarreia em países subdesenvolvidos, onde as condições de saneamento são precárias,

principalmente nos trópicos (REIS, 2007). Além disso, são consideradas um dos principais agentes etiológicos da “diarréia dos viajantes”, que acomete indivíduos de qualquer faixa etária que se locomovem de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico (MENG et al., 2001). ETEC é causa de diarréia aguda não só no homem como também em animais em todo o mundo (NARDI et al., 2005).

Estima-se que aproximadamente 20 milhões de episódios de diarréia ocorram anualmente, sendo que 80% dos casos são de origem bacteriana. Destes, o grupo ETEC, juntamente com EaggEc, são responsáveis por 50% (MINCIS et al., 2008).

Embora possam ser transmitidas por contato pessoal (CLARKE, 2001), alimentos e água contaminada com despejos de esgoto são os veículos de contaminação mais freqüentes para o homem (GERMANO & GERMANO, 2008).

Os principais fatores de virulência de *E. coli* do grupo ETEC são as enterotoxinas e as adesinas fimbriais (ZANG et al., 2006). Aderem e colonizam a mucosa do intestino delgado mediante a presença de fímbrias, estruturas protéicas localizadas nas superfícies das células bacterianas, codificadas por plasmídeos e denominadas fatores de colonização. Essas cepas contém plasmídeos com genes que codificam a produção de toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), sendo a primeira semelhante à toxina colérica (GONÇALVES et al., 2002).

As cepas de ETEC causam uma hipersecreção prolongada de íons cloreto e água pelas células da mucosa do intestino e inibem a reabsorção de sódio. O intestino fica repleto de fluídos, resultando em diarréia líquida que continua por vários dias. As enterotoxinas incluem uma toxina termoestável (ST) que causa uma elevação dos níveis celulares de guanilciclase, enquanto a toxina termolábil (LT) causa uma elevação da adenilciclase (STROHL, 2004).

O período de incubação da doença varia de oito a 44h, com média de 26 horas, enquanto que curso pode variar de três a 19 dias (GERMANO & GERMANO, 2008).

Os principais sintomas são diarréia aquosa, febre branda, cólicas abdominais, mal estar e náuseas. Nos casos mais graves, a intensidade e o aspecto da diarréia assemelham-se à dos quadros de cólera e pode levar o

paciente à desidratação (GERMANO & GERMANO, 2008). Em indivíduos desnutridos, a gastrinterite pode durar várias semanas e levar a um quadro de desidratação grave, porém nos casos de “diarréia do viajante”, a doença geralmente é leve e auto-limitante (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

São sorovares comumente associados a surtos de veiculação alimentar no Japão O6:H16, O27:H7, O27:H20 e O159:H20 (MITSUDA et al., 1998). Já nos EUA, O169:H41 é predominante nos surtos (BEATTY et al., 2004).

Em 42 cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarréia em Curitiba, SOUZA et al. (2007), encontraram como sorogrupos mais prevalentes O138:K81, O141:K85, O139:K82, O149:K91, responsáveis pela colibacilose.

c) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

As cepas deste grupo são patogênicas e sua virulência é devida à habilidade para invadir células epiteliais intestinais (HUI et al., 1994; SMITH et al., 2004).

Correspondem a sorovares bem definidos, caracterizados por seus antígenos O e ausência quase constante de antígeno flagelar (TRABULSI et al., 2008), notando-se que todos apresentam em comum com *Shigella* várias características bioquímicas, antigênicas, genéticas e de patogenicidade (HUI et al., 1994). Entre eles estão O24, O21, O28ac, O124, O29, O112c, O135, O136, O143, O144, O152, O164, O167 e O173 (LAN et al., 2004).

Invadem as células epiteliais do cólon e em seguida provocam a lise do vacúolo endocítico. Movem-se no citoplasma da célula através da polimerização de microfilamentos de actina. A bactéria pode mover-se lateralmente através do epitélio, por disseminação direta de célula a célula e penetrar novamente na membrana plasmática pela superfície basolateral. Os genes requeridos nesse processo estão localizados em um plasmídio de virulência, que codifica um sistema de secreção tipo III e uma proteína de membrana externa associada com a polimerização da actina (FARAH, 2005).

Após a invasão, proliferam no interior dos enterócitos e destroem o epitélio do cólon, produzindo um quadro cujos sintomas principais consistem

em diarreia profusa ou disenteria, podendo estar presentes muco e vestígios de sangue, cólicas abdominais, arrepios, cefaléia e mialgia (GERMANO & GERMANO, 2008).

O período de incubação varia de oito a 24 horas, com média de 11 horas. A recuperação geralmente é lenta e pode demorar algumas semanas (GERMANO & GERMANO, 2008).

Os surtos estão relacionados à ingestão de água e/ou alimentos contaminados e envolvem principalmente o sorogrupo 0124. Porém, a forma de transmissão mais comum é o contato pessoa-pessoa (MENG et al., 2001).

d) *E. coli* enteroagregativa (EaggEc)

Recebem esta denominação por formarem um padrão agregativo de adesão em células HEp-2 ou HeLa. Provocam lesões caracterizadas por hiperplasia moderada do íleo e ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e deposição de camadas de bactérias agregadas, empilhadas sobre o epitélio (TRABULSI et al., 2008).

Produzem toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), que são genética e imunologicamente diferentes das enterotoxinas produzidas pelo grupo ETEC. Estas cepas afetam o metabolismo celular do enterócito, interferindo na absorção de sais e eletrólitos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Este grupo também está relacionado a casos crônicos de diarreia, principalmente aguda e persistente em crianças de países em desenvolvimento, estando mais associada a crianças com menos de dois anos de idade (CLARKE et al., 2001; NGUYEN et al., 2006).

e) *E. coli* difusamente aderente (DAEC)

As cepas de DAEC são definidas pelo padrão difusamente aderente apresentado em ensaios de aderência em células HEP-2 e causa uma síndrome de diarreia aquosa em adultos e crianças com mais de um ano de idade (SOUSA, 2006; KAPER et al., 2004).

Apresentam na superfície fímbrias rígidas, sítio de aderência, cuja presença é transmitida e codificada por plasmídios (KANG et al., 1998). A maioria dos sorovares de *E. coli* DAEC apresenta a adesina F1845, responsável pela aderência difusa da bactéria ao epitélio intestinal, e induzem efeito citopático caracterizado pelo desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem o local ao redor da bactéria aderida, sem internalização da mesma (KAPER et al., 2004).

São associadas mais freqüentemente à diarreia persistente e sua presença é considerada fator de risco para quadro persistente (BARDHAN et al., 1998).

f) *E. coli* Uropatogênica (UPEC)

O agente etiológico mais comumente isolado das infecções do trato urinário é a *E. coli* UPEC (SCHAECHTER et al., 2002).

Cepas de *E. coli* UPEC possuem fatores de virulência específicos como os sistemas de aderência, toxinas, sistemas de absorção de ferro que as distinguem de cepas *E. coli* não patogênicas (SOUSA, 2006).

A hemolisina é um fator de virulência presente em UPEC, disponibilizando ferro e favorecendo a destruição de células epiteliais e fagocíticas (KAPER et al., 2004).

Entre os sorogrupos incluídos no grupo UPEC estão O6:H31 e O75:H⁻, isolados de amostras de indivíduos com infecções urinárias sintomáticas e assintomáticas no Rio de Janeiro (ESPARIS et al., 2006).

g) *E. coli* Neonatal causadora de Meningite (NMEC)

Essas cepas formam outro grupo de *E. coli* patogênica extraintestinal (BONACORSI & BINGEN, 2005). O18:K1:H7A é um dos sorovares pertencentes ao grupo NMEC e comumente é relacionado a infecções do trato urinário (JOHNSON et al., 2001).

Em neonatos, 20% dos casos são acompanhados por complicações no trato urinário (BONACORSI et al., 2003). As cepas NMEC atravessam a luz intestinal e caem na corrente sanguínea, causando bacteremia, quando estão em numero superior a 10^3 UFC/cm² (DIETZMAN et al., 1974). NMEC são capazes de fazer um rearranjo na actina do citoesqueleto de células microvasculares endoteliais do cérebro, causando doença (KIM, 2001).

h) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

O principal componente de virulência de cepas EHEC é a produção de uma toxina que tem atividade citotóxica em células vero, denominada verotoxina (VT). Devido à sua similaridade com a toxina produzida por *S. dysenteriae* é denominada toxina Shiga (Stx) ou toxina “Shiga-like” (SLT) (CLARKE, 2001).

A verotoxina é uma proteína codificada por um gene cromossômico facilmente transferido por bacteriófagos para cepas de *E. coli* (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002). É mediadora das complicações sistêmicas das infecções causadas por EHEC e também induz lesões A/E no epitélio intestinal, ao qual a bactéria adere intimamente à superfície apical dos enterócitos através da formação de pedestais e destruição das microvilosidades (NATARO & KAPER, 1998).

A verotoxina é responsável pela colite hemorrágica que, em casos mais graves, resulta na síndrome urêmica-hemolítica (HUS), complicação que ocorre em 2% a 7% dos casos diagnosticados com *E. coli* O157:H7 (FDA, 2007). Púrpura trombótica trombopênica (TTP) é outra complicação que afeta principalmente adultos com febre e distúrbios neurológicos (FDA, 2007).

Este grupo inclui mais de 60 sorotipos que produzem verotoxina (SILVA et al., 2003), porém o sorotipo O157:H7 é o mais freqüentemente associado a surtos de colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica, apresentando maior preocupação para as autoridades de saúde pública (GERMANO & GERMANO, 2008). Os sorotipos O103 (HEINIKAINEN et al., 2007), O111 (HEINIKAINEN et al., 2007), O26:H11 (BLANCO et al., 2003) e

O145 (SONNTAG et al., 2004) também têm sido relacionados a doenças e surtos de veiculação alimentar.

Nas infecções por *E. coli* O157:H7, os primeiros sintomas surgem em geral quatro dias após a ingestão do alimento contaminado, mas pode variar de três a nove dias. O quadro de colite hemorrágica caracteriza-se por diarreia sanguinolenta, que pode evoluir e provocar nefropatia aguda, convulsões e conduzir ao coma e morte (GERMANO & GERMANO, 2008).

Em idosos, a HUS, associada à febre e sinais neurológicos, constitui a PPT e os pacientes que conseguem superar a doença recuperam-se em dois a nove dias (GERMANO & GERMANO, 2008).

2.2 Associação com alimentos

- *E.coli*

A água contaminada com despejos de esgoto é uma das vias de contaminação mais importantes de *E. coli*. Qualquer alimento exposto à contaminação fecal, seja pela água de preparo contaminada ou por manipuladores infectados, ou por qualquer outro tipo de contaminação cruzada, é capaz de veicular *E. coli* (GERMANO & GERMANO, 2008).

Em estudo realizado por OLIVINDO (2007) na Embrapa Caprinos em Sobral, Ceará, visando monitorar a qualidade do leite de cabra, foram coletadas na primeira ordenha do dia 40 amostras de mãos de ordenhadores, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água. A presença de *E. coli* foi detectada em todas as fontes, com aproximadamente 75% de similaridade para a maioria dos isolados, utilizando a técnica de REP-PCR. Segundo o autor, água não potável foi utilizada para lavar as mãos do ordenhador e a teteira, caracterizando-se como um ponto crítico de controle (PCC), pois apareceu como iniciador de contaminação por *E. coli* nas amostras de leite analisadas.

Produtos de origem animal, principalmente carne e derivados cárneos são importantes veículos em enfermidades por *E. coli* e vários autores ressaltaram a presença da bactéria em uma variedade de produtos no Brasil. *E. coli* patogênica foi isolada de 32,4% das amostras de carne bovina moída,

hambúrguer e quibe, analisados no Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1997). Na cidade de São Luís, *E. coli* foi isolada em carne bovina moída comercializada em mercados (COSTA et al., 2000) e também em supermercados, feiras e frigoríficos (FERREIRA & SOBRINHO, 2003). A presença da bactéria também foi observada por MOTTA et al. (2000), ao analisarem amostras de carne moída comercializada em supermercados de São Paulo e em Porto Alegre, foi isolada de carne moída comercializada em bancas do mercado público (RITTER et al., 2001), enquanto que em Curitiba, três açougues comercializavam carnes contaminadas com *E. coli* (PIGATTO & BARROS, 2003). A presença de *E. coli* em carnes suínas e bovinas comercializadas em Alfenas, MG também foi relatada (OLIVEIRA et al., 2002).

Em Goiás, LOPES (2005) conduziu um estudo objetivando avaliar a ocorrência de coliformes, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *E. coli* O157:H7 em meias carcaças bovinas quentes e resfriadas em dois matadouros-frigoríficos de grande porte. Foram analisadas 60 amostras coletadas no período de junho a agosto de 2004 e 19 (31,66%) foram positivas para *E. coli* no total analisado. No Frigorífico A, 06/30 (20,0%) e 10/30 (33,33%) meias-carcaças quentes e resfriadas, respectivamente, foram positivas para *E. coli*. No Frigorífico B, foram identificadas 02/30 (6,67%) meias-carcaças quentes positivas e, nas meias-carcaças resfriadas, 01/30 (3,33%).

FRANÇA-FILHO (2005) analisou a qualidade microbiológica de 160 meias-carcaças bovinas abatidas em dois Matadouros-Frigoríficos de grande porte em Goiânia, sendo 80 quentes e 80 resfriadas, amostradas através de “swabs” superficiais em colhidos em três pontos nas meias-carcaças. Foram determinados o Número Mais Provável (NMP), dentre outros microrganismos, de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli*, e obtidas médias de 4,5 NMP/cm², 0,15 NMP/cm² e 0,15 NMP/cm², respectivamente. Com relação aos coliformes termotolerantes e *E. coli*, a correlação verificada foi de 100%. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para meias-carcaças quentes e resfriadas, o que demonstrou que o resfriamento não contribuiu para incrementar ou diminuir a carga bacteriana das meias-carcaças.

RIOS (2005), objetivando detectar *E. coli* em superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas de bovinos abatidos em dois matadouros-

frigoríficos de abate bovinos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal localizados em Goiânia, através das técnicas bacteriológica convencional e de PCR, foram analisadas amostras coletadas no período de junho a setembro de 2004. No total da amostragem, 35/80 (43,75%) foram positivas para *E.coli*, sendo que nas meias-carcaças quentes do matadouro-frigorífico A, foram obtidas dez (22,20%) positivas e nas resfriadas 13 (28,80%), enquanto que no B quatro (11,40%) e oito (22,80%) meias-carcaças quentes e resfriadas foram positivas, respectivamente.

Das 50 amostras de fezes analisadas em 2007 em Ouro Preto, MG por REIS (2007), cepas patogênicas de *E. coli* foram verificadas em 86% das amostras. Após sorotipagem, 76% destas eram EPEC. O estudo apontou a prevalência de crianças com diarreia nesta cidade e atribui à precariedade do saneamento básico e às deficientes condições de higiene da população dos bairros peri-urbanos.

Em trabalho conduzido por STELLA et al. (2008) objetivando caracterizar os principais sorogrupos de EPEC de sete propriedades leiteiras de Ribeirão Preto-SP, foram coletadas 19 amostras de água, sete de leite e 466 de fezes de bovinos, num total de 492 amostras. *E. coli* foi isolada de 442 amostras, e 20% destas foram caracterizadas em nove sorogrupos EPEC, sendo o O158 e O55 os mais freqüentes.

Foram analisados por NAJAND & GHANBARPOUR, em 2006, 77 amostras de queijos caseiros iranianos comercializados em mercados na cidade de Kerman, Iran, cujo objetivo era analisar os sorotipos de *E. coli* e sua prevalência em queijos caseiros desta região. *E. coli* foi isolada de 98.70% amostras, sendo que 19.48% das cepas eram EPEC. Foram detectados oito diferentes sorogrupos, sendo mais freqüente o sorogrupo O127. Resultado semelhante foi encontrado no Brasil, quando ARAÚJO et al. (2002) detectaram alto índice de contaminação fecal em amostras de queijo comercializado no Rio de Janeiro. Do total de queijos analisados, 95.5% continham *E. coli*, sendo que 21,1% das cepas eram EPEC. Provavelmente estes queijos foram fabricados com leite não pasteurizado.

SILVA et al. (2001), objetivando avaliar a qualidade microbiológica de leite pasteurizado, isolar e identificar sorologicamente cepas EPEC nesse alimento, coletaram 90 amostras do produto em supermercados do Rio de

Janeiro no período de 1995 e 1996. Um total de 208 colônias de *E. coli* foram isoladas, sendo que 46 (22,1%) foram sorologicamente identificadas como EPEC. O sorogrupo O55 teve a maior frequência, em 15,2% das amostras.

Objetivando o isolamento e a identificação de *E. coli* em carne moída de primeira e de segunda qualidade comercializada em Pelotas, BERNARDI et al. (2004) coletaram 66 amostras em casas especializadas a venda de carne. Do total analisado, 48/66 (72,73%) encontravam-se contaminadas com *E. coli*. Foram submetidos à sorologia 46 isolados e destes, 34/66 (51,51%) foram confirmadas como EPEC.

KASNOWSKI (2004) isolou e identificou *E. coli* de 30 amostras de alcatra comercializada em supermercados e açougues da cidade do Rio de Janeiro. Foram isoladas 223 colônias de *E. coli*, sendo que 61/223 (27,35%) eram de cepas patogênicas, mais frequentes na carne moída que na peça inteira. Dentre as cepas patogênicas, 52/223 (85,25%) eram representadas por EPEC. Os sorogrupos encontrados foram O142, O125 e O111.

No Brasil uma cepa EHEC do sorovar O26:H11 foi isolada de fezes de crianças com quadro de diarreia na cidade de Salvador, Bahia, em 2005 (FRANZOLIN et al., 2005).

- *E. coli* O157:H7

O principal reservatório de EHEC é o trato gastrointestinal de animais, particularmente bovinos, para os quais esta bactéria não apresenta patogenicidade (NAYLOR et al., 2003). Vegetais, leite não pasteurizado e água podem se contaminar quando entram em contato com fezes contaminados com *E. coli* O157:H7 (DURSO et al., 2005).

A contaminação de carcaças durante o abate, principalmente em plantas com condições higiênico-sanitárias precárias, em particular nos Estados Unidos, tem sido apontada como uma das principais fontes de contaminação por *E. coli* O157:H7 em carnes bovinas (GERMANO & GERMANO, 2008).

Os cortes cárneos moídos nessas plantas para fabricação de hambúrguer podem dar origem a um produto final contaminado, devido à disseminação do patógeno para o interior da massa, à medida que a carne sofre fragmentação (GERMANO & GERMANO, 2008).

GUN et al. (2001), objetivando investigar a contaminação por *E. coli* O157:H7 em meias-carcaças quentes de bovinos e no ambiente do matadouro-frigorífico, analisaram 330 bovinos no período “ante-mortem” para a observação da presença de fezes no abdome e pernas, em Istambul, Turquia, no período de Janeiro de 2000 a Abril de 2001. No fluxograma de abate, foram analisadas superfícies de meias-carcaças bovinas, amostras de ambiente, piso, mãos dos manipuladores, água de lavagem de carcaças, facas e ganchos. Das meias-carcaças quentes analisadas, 12/330 (2,4%) foram positivas para *E. coli* O157:H7 e a bactéria foi identificada na faca, piso e mão de manipuladores. Do total de animais analisados, 116/330 estavam muito contaminados com fezes e oito meias-carcaças positivas pertenciam a esses animais.

O hambúrguer, responsável pela ocorrência de surtos de *E. coli* O157:H7 nos Estados Unidos (CDC, 1994), sobretudo quando consumido insuficientemente cozido, constitui o veículo mais freqüente nas toxinfecções por *E. coli* (KASSENBERG et al., 2004) e os hambúrgueres de preparo caseiro foram responsáveis por mais de 80% dos casos esporádicos de enfermidades por *E. coli* O157:H7 que ocorreram nos EUA em 1994 (CDC, 1994).

Falhas durante o processamento e o cozimento de hambúrgueres são atribuídas à contaminação cruzada e ao tratamento térmico insuficiente, fatores diretamente relacionados aos surtos causados por produtos cárneos em geral (KASSENBERG et al., 2004). Durante a produção do hambúrguer, tanto em estabelecimentos industriais e varejistas como na fabricação caseira, pode ocorrer contaminação resultante de práticas inadequadas de higiene ou por adição de condimentos ou outros ingredientes contaminados (JAY, 2005). Ressalta-se que, embora a bactéria seja termolábil, o tratamento térmico eficiente não assegura a eliminação completa do patógeno, uma vez que sua eficiência é afetada pelo número da bactéria inicialmente presente na matéria-prima.

O primeiro registro de detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos no Brasil ocorreu em Goiânia, em 2005, em meias-carcaças quentes e resfriadas

de bovinos (RIOS, 2005). As 80 meias-carcaças analisadas foram coletadas em dois matadouros-frigoríficos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal, no período de junho a setembro de 2004. O isolamento de *E. coli* O157:H7 foi realizado pela técnica de PCR, utilizando o par de “primers” de WANG et al. (1997). Foram detectadas 10/80 (8%) amostras positivas no total analisado, representando 09/80 (11,25%) meias-carcaças. No total de meias-carcaças 06/80 (7,50%) quentes foram positivas e 04/80 (5%) resfriadas. No Matadouro-Frigorífico A *E. coli* O157:H7 foi identificada em 01/45 (2,22%) meia-carcaça quente e em 03/45 (6,66%) resfriadas, enquanto que no B, 05/35 (14,28%) e 01/35 (2,85%) meias-carcaças quentes e resfriadas, respectivamente.

Os produtos de origem vegetal consumidos crus também constituem risco relevante em saúde pública, principalmente se oriundos de culturas irrigadas com águas de despejos contaminados com matéria fecal (GERMANO & GERMANO, 2008).

No Brasil, uma cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada em 1997, de uma amostra de água de poço, em uma chácara na cidade de Parelheiros, São Paulo (DTA, 2000).

O Instituto Adolf Lutz notificou ao CVE, em 2001, o isolamento de *E. coli* O157:H7 em fezes de uma criança de um ano e nove meses, que apresentava febre, cólicas, diarreia sanguinolenta e dores abdominais. A bactéria também foi isolada, neste mesmo período, de fezes de um adulto de 20 anos de idade, que apresentava os mesmos sintomas. A notificação tardia dificultou a investigação epidemiológica e a determinação da fonte do patógeno (EDUARDO et al., 2003). Há ainda o registro de *E. coli* O157:H7 em um paciente com AIDS de 18 anos de idade, que apresentava quadro de diarreia, em 1990, não tendo sido possível estabelecer relação com alimentos ou a origem da infecção (IRINO et al., 2002).

Até 2005 não haviam dados sistemáticos indicando a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em alimentos no Brasil. SILVEIRA et al. (1999) analisaram 800 amostras de hambúrgueres produzidos por matadouros-frigoríficos do Sul e Sudeste brasileiros e não identificaram *E. coli* O157:H7. De forma semelhante, SILVA et al. (2001) não detectaram a bactéria em 340 amostras de produtos cárneos e ambiente industrial, assim como SILVA et al. (2003), que também

não detectaram em vegetais. *E. coli* O157:H7 não foi identificada em estudo conduzido por LOPES (2005), em meias-carcaças quentes e resfriadas bovinas em Goiás, através da técnica bacteriológica convencional.

Na Argentina, ROLDÁN et al. (2007) isolaram *E. coli* O157:H7 de 1,2% de 250 amostras de hambúrgueres comercializados entre julho de 2004 a abril de 2006 nas cidades de Santa Fé e Santo Tomé, não tendo sido isolada de amostras de leite cru resfriado, neste mesmo trabalho.

2.3 Importância em saúde pública

- *E. coli*

Em 1996 um grande surto causado por ETEC O25:NM ocorreu em quatro escolas na cidade de Yokohama, no Japão, envolvendo 801 pessoas. A bactéria foi isolada do patê de atum, servido no lanche, que continha pedaços de atum, maionese, mostarda, cenoura, cebola e pepino. Esses três últimos ingredientes foram levados às escolas pelo mesmo entregador, sendo portanto incriminados como veículo da doença (MITSUDA et al., 1998).

Em 1998, severos surtos causados por ETEC foram registrados na região do Rio Solimões, no Amazonas. Quatro crianças, entre dois e 12 meses de idade e dois adultos morreram devido à diarreia aguda. Outras 11 pessoas foram hospitalizadas (VICENTE et al., 2005).

Em 2003 ocorreu um surto causado por ETEC O169:H41 em uma empresa localizada no estado do Tennessee, EUA, onde os funcionários apresentaram os sintomas da doença, não sendo identificada a fonte de contaminação pela bactéria (DEVASIA et al., 2006).

Um surto por *E. coli* do grupo EIEC nos Estados Unidos ocorreu em 1971, atingindo 14 estados. Queijo “Camembert” importado da França foi incriminado como veículo do patógeno, que debilitou aproximadamente 400 pessoas (MENG et al., 2001).

Outro grande surto foi registrado em 1985 em Houston, EUA (GORDILLO et al., 1992). Foram atingidas 370 pessoas e EIEC O143 foi isolada de “guacamole”, preparado por um restaurante popular na região.

Em estudo conduzido por VIEIRA et al. (2007), objetivando isolar cepas do grupo EIEC e identificá-las como principais sorovares responsáveis por quadros de diarreia no norte do Equador de 2003 a 2005, foram coletadas amostras de fezes de casos de diarreia que surgiram neste período na cidade de Bórbon, Equador, e em 21 vilas desta região. Foram identificados 342 casos de diarreia, sendo que EIEC foi o patógeno mais freqüente responsável por 20,5 casos/100 pessoas em Bórbon e 6,3 casos/100 pessoas nas vilas. As cepas isoladas foram caracterizadas pela técnica de PFGE e os resultados indicaram que estas não eram de uma única fonte.

Em estudo conduzido por NGUYEN et al. (2006) no Vietnã, 587 crianças com menos de cinco anos de idade que apresentavam diarreia foram examinadas e de todas as cepas identificadas como EaggEc, 87% foram isoladas de crianças com menos de dois anos de idade.

Em vários países, inclusive no Brasil, cepas EaggEc têm sido fortemente associadas à diarreia persistente, com duração igual ou superior a 14 dias. A presença de sangue ocorre em 11% dos casos (MENG et al., 2001). Além disso, alguns estudos revelam que sua presença nos primeiros dias de um episódio de diarreia é fator preditivo de doença prolongada (TRABULSI et al., 2005).

Em 1994, foi relatada a ocorrência de quatro surtos associados a alimentos em um restaurante na Inglaterra que afetaram 133 pacientes. Os sorogrupos envolvidos foram O86:H34 e O98:H⁻ (MENG et al., 2001).

No oeste da África, estudos apontaram diarreia persistente causada por EaggEc em 20% dos viajantes dessa região, enquanto que Índia, América Central e América do Sul apresentaram, respectivamente, 15%, 6% e 7% de viajantes com sintomas de diarreia causada por EaggEc (VILA et al., 2001).

Em estudo conduzido por JALALUDDIN et al. (1998), objetivando determinar a prevalência de EaggEc em casos de crianças africanas com diarreia na cidade de Lwiro, Congo, foi detectada a presença de EaggEc em 56 de um total de 115 amostras de fezes analisadas, sendo que em 22 casos (19,1%), este microrganismo encontrava-se sozinho.

Em 2005, EaggEc O126:H27 foi isolada em quatro amostras de fezes e da mão de um manipulador de alimentos em Shizuoka, Japão (HARADA et al., 2007). O pequeno surto atingiu sete funcionários do instituto policial desta cidade, que apresentavam sintomas clínicos de diarreia e febre.

SCALESTKY et al. (2002) conduziram estudo no Nordeste brasileiro, tendo sido coletadas no período de 1998 a 1999 fezes de 237 crianças com menos de 2 anos de idade que apresentavam quadro de diarreia aguda. Cepas DAEC foram associadas com diarreia em crianças com mais de um ano de idade, por estar presente em 20,7% das amostras analisadas.

Em estudo conduzido no Brasil por SPANO et al. (2008), foram analisadas amostras de fezes no período de 2003 e 2004 em Vitória, Espírito Santo, de 218 crianças com menos que dois anos de idade que apresentavam quadro diarréico. De 92 cepas de *E. coli* patogênicas identificadas, DAEC foi o grupo mais freqüente, presente em 18,3% das amostras.

- *E. coli* O157:H7

Além de produtos de origem animal, como leite e carne bovina (CDC, 2004), já foram incriminados como veículos em surtos por *E. coli* O157:H7 em frutas e vegetais (FENG, 1995; CDC, 1997). Estes surtos têm ocorrido com maior freqüência nos Estados Unidos (CDC, 2006; CDC, 2008), Canadá (MacDONALD et al., 2004) e Japão (WATANABE et al., 1999).

Desde o primeiro surto confirmado com *E. coli* O157:H7 em 1983 nos EUA (RILEY et al., 1983), muitos outros foram descritos. Em 1996, na cidade de Sakai, Japão, muitas crianças apresentaram quadro de diarreia e diarreia sanguinolenta, sendo que 398 destas foram hospitalizadas. *E. coli* O157:H7 foi isolada de amostras de rabanete produzido em uma fazenda da região (MISHINO et al., 1999), e os níveis de contaminação pelo patógeno neste alimento eram muito baixos, de apenas 4UFC/25g do produto (SHINAGAWA, 1997).

Em 2006 foram recolhidos espinafres comercializados em supermercados de 23 Estados nos EUA após a ocorrência de um surto que afetou aproximadamente 204 pessoas, resultando em 102 hospitalizações,

sendo confirmados 31 casos de HUS e três mortes. Ao reconhecer a gravidade do problema, o FDA publicou um aviso para que as pessoas não ingerissem espinafre fresco ou produtos que continham espinafre fresco. Coletas de dados e análises estatísticas realizadas pelo FDA e CDC relacionaram o centro de processamento de vegetais “Natural Selection”, localizado em San Juan Batista, na Califórnia, ao espinafre contaminado por *E. coli* O157:H7. Foi feito o recolhimento de todo o espinafre produzido do dia 17 de agosto até 01 de outubro de 2006 (FDA, 2007).

De julho a setembro de 2007, um surto associado à carne bovina congelada contaminada por *E. coli* O157:H7 levou ao recolhimento do produto em oito estados nos EUA, atingindo aproximadamente 40 pessoas. A bactéria foi identificada pela técnica de PFGE após ser isolada de fezes de pessoas que apresentavam a doença e da carne consumida, apresentando diferentes perfis genéticos. (CDC, 2007).

No início de 2008 o Canadá iniciou um grande recolhimento de carne congelada e resfriada contaminada com *E. coli* O157:H7, produzida, comercializada e distribuída de fevereiro a maio pelas empresas “Belmont Meat Products Ltd.”, “Costco Wholesale”, “Steakhouse Beef Burgers” e “M&M Meat Shops”. O alerta foi anunciado pela Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (CFIA) a partir do surgimento de pessoas doentes, cujo problema foi associado ao consumo de carne (CFIA, 2008).

Atualmente os EUA passam por um surto provocado por *E. coli* O157:H7 associado à carne bovina comercializada pela empresa “Kroger Co”. O surto abrange os Estados de Indiana, Kentucky, New York, Georgia, Michigan e Ohio, onde foram identificados 45 casos. Estudos epidemiológicos e técnicas de caracterização molecular estão sendo utilizados no isolamento e identificação do patógeno. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) confirmou que não existem mais produtos contaminados nas prateleiras das lojas, porém os consumidores devem ficar atentos ao estoque que possuem em casa, relacionando a empresa responsável pela distribuição da carne contaminada, os lotes envolvidos no recolhimento dos produtos e as datas de fabricação em questão (CDC, 2008).

2.4 Papel do bovino e outros animais na epidemiologia

E. coli é uma bactéria normal do trato gastrointestinal dos animais. Eliminada nas fezes desses animais, pode contaminar o ambiente e se disseminar (QUINN et al., 1994).

Através do contato com essas fontes ambientais ocorre a contaminação e posterior colonização do trato intestinal dos mamíferos logo após o nascimento e permanece como membro importante da microbiota indígena do intestino. Muitos sorotipos de *E. coli* são de baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas quando localizadas extra-intestinalmente, como na glândula mamária e trato urinário (QUINN et al., 1994).

A ausência de receptores vasculares para a verotoxina em bovinos os tornam resistentes aos efeitos das toxinas produzidas por *E. coli* O157:H7 (PRUIMBOOM-BREES et al., 2000) e esta espécie animal é considerada reservatório deste sorovar (BESSER et al., 2001).

Outros animais domésticos também têm sido apontados como portadores deste patógeno, como ovinos (PAO et al., 2005), suínos (KIJIMA-TANAKA et al., 2005) e aves domésticas (NOWAK et al., 2006).

As taxas de prevalência de *E. coli* O157:H7 em bovinos é dependente da idade do animal e da estação do ano, notando-se que bezerros apresentam a bactéria em números elevados e por um período de tempo mais prolongado que os adultos. O número de células bacterianas em bovinos também varia ao longo do ano, observando-se que mais de 80% podem se infectar nos meses do verão e menos de 10% no inverno (CALLAWAY et al., 2002).

Nos Estados Unidos, as taxas de prevalência de *E. coli* O157:H7 em vacas varia de 0,2% a 8,4%, de 1,6% a 3,0% em novilhas e de 0,4 a 40% em bezerros com idade entre dois e 24 meses, podendo-se observar que a contaminação de carcaças por fezes durante o abate ocorre frequentemente (HUSSEIN & SAKUMA, 2005).

A disseminação mundial de *E. coli* O157:H7 possivelmente indica que este microrganismo estabeleceu um nicho ecológico onde suas toxinas podem aumentar a sobrevivência (ROWLANDS et al., 2007).

Embora não existam dados sobre a prevalência de *E. coli* O157:H7 em bovinos no Brasil, muitos autores relatam a ocorrência da bactéria em alguns Estados. CERQUEIRA et al. (1999) avaliaram a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em 197 bovinos leiteiros e de corte no Rio de Janeiro, e isolaram a bactéria em 1,5% das fezes de animais sadios. No Estado de São Paulo, *E. coli* O157:H7 foi isolada de bovinos leiteiros jovens em 2005, com frequência de 0,6% (IRINO et al., 2005) e, em 2008, de 442 amostras analisadas de fezes de bezerros de propriedades leiteiras da região de Ribeirão Preto, SP, o sorovar foi verificado em 0,45% (STELLA et al., 2008).

NAKASONE et al. (2005) obtiveram frequência de 0,5% em 100 amostras de fezes de bezerros analisadas em 2003 no Vietnã, sendo este o primeiro relato do patógeno no país.

MOBLEY et al. (2004) indentificaram a presença de *E. coli* O157:H7 em 75% das 68 amostras de fezes de caprinos de corte de 12 propriedades na Flórida, EUA. A presença deste sorovar em percentual elevado sugere que esta espécie possa constituir uma fonte potencial de *E. coli* O157:H7 em surtos de origem alimentar associados ao consumo de carne caprina e derivados. Na ocasião, os autores ressaltaram que o aumento verificado na oferta da carne de caprinos e produtos derivados e sua maior aceitação pelos consumidores tornaram urgente a adoção de medidas visando a segurança microbiológica e a qualidade desses alimentos, tendo sugerido que investimentos na educação dos produtores e consumidores seriam medidas urgentes a serem implementadas a fim de reduzir os riscos da ocorrência de enfermidades determinadas por *E. coli* O157:H7.

Durante a remoção da pele, a superfície externa das carcaças fica exposta ao ambiente e as bactérias podem se aderir à superfície e serem levadas para o interior da musculatura a partir de incisões ou cortes realizados subsequentemente. Além disso, aerossóis e poeira contaminados, gerados pela remoção da pele, podem contaminar as mãos dos manipuladores e favorecer o aumento da disseminação ambiental da bactéria, assim como contribuir para maior contaminação cruzada durante o abate (BERSOT, 2001).

Na evisceração, a contaminação se dá mais comumente através do rompimento de porções do trato gastrointestinal por facas e/ou outros objetos perfuro-cortantes, ou quando há extravasamento de conteúdo fecal por má

oclusão do reto ou pelo rompimento de vísceras durante o tracionamento para retirada do trato gastrointestinal. A musculatura ainda pode ser contaminada devido à migração de microrganismos do lúmen intestinal para as grandes massas musculares, devido à alteração de permeabilidade que pode ocorrer quando há evisceração retardada (LOWRIE et al., 1969).

Finalmente, há ainda que se considerar a contaminação oriunda do ambiente de processamento, através de contaminação cruzada das carcaças e/ou meias-carcaças com piso, paredes, superfície de contato, facas, mãos e água (BERSOT, 2001; TUTENEL et al., 2003).

A presença de *E. coli* O157:H7 na pele bovina representa um dos principais riscos de contaminação em meias-carcaças. Nos matadouros-frigoríficos modernos são poucas as falhas verificadas no processo de evisceração, o que contribui para reduzir os riscos de contaminação (TUTENEL et al., 2003). Os matadouros-frigoríficos norte-americanos têm feito mudanças significativas em seu processo de produção para reduzir a contaminação e aumentar a segurança microbiológica da carne e de seus derivados (RENTER et al., 2008). Estas intervenções têm sido eficientes e reduzido os níveis de contaminação por *E. coli* O157:H7 no período “ante-mortem” (BARKOCY-GALLAGHER et al., 2003).

O desenvolvimento de potenciais intervenções pré-abate estão sendo estudadas, como o uso de vacinas, probióticos, antibióticos, antimicrobianos, bacteriófagos, a mudança na dieta do gado e um bom gerenciamento desses animais (CALLAWAY et al., 2004).

Estratégias de avaliação e monitoramento da efetividade dos procedimentos de controle de *E. coli* O157:H7 nas indústrias de carne bovina e sistemas comerciais de derivados cárneos também estão sendo propostas, como a coleta de amostras individuais de fezes e pele antes do abate, para identificar os bovinos que apresentam risco à segurança alimentar (STANFORD, 2005). O abate dos animais positivos seria realizado no último lote como forma de promover a redução nas contaminações por fezes ou pela pele, gerenciando os potenciais riscos, como adotado para outros patógenos (RENTER et al., 2008).

Objetivando avaliar a prevalência e os fatores de risco associados a *E. coli* O157:H7 em bovinos no período “ante-mortem”, bem como a relação

entre os métodos de monitoramento do patógeno, RENTER et al. (2008) conduziram um estudo em Alberta, EUA, nos períodos de julho a dezembro de 2003 e de abril a novembro de 2004. Foram coletadas amostras de fezes frescas de piso e pele dos animais. Foram acompanhados 87 períodos “ante-mortem”, de aproximadamente 27000 cabeças, no total, referentes a 44 lotes. Durante o primeiro período, correspondente ao verão, cujas temperaturas são mais altas, *E. coli* O157:H7 foi isolada em 39/44 lotes (88,6%), enquanto que no segundo período, correspondente ao inverno, verificaram-se 24/40 (60%) lotes positivos. Para os autores, um dos fatores relacionados foi a estação do ano, que interfere na temperatura ambiente e na umidade do ar, que juntas concorrem para aumentar as taxas de positividade de *E. coli* O157:H7. As condições de manejo dos bovinos e o número de animais por lote também influenciaram nos resultados.

Devido à implementação de programas de qualidade, incluindo HACCP nos frigoríficos da Sérvia, Europa, até o ano de 2007 não haviam dados que indicassem a ocorrência de *E. coli* O157:H7 neste país (NASTASIJEVIC et al., 2008). Em estudo conduzido por NASTASIJEVIC et al. (2008), objetivando estabelecer a freqüência e os locais onde *E. coli* O157:H7 está presente, foi analisada a pele de bovinos. O trabalho foi realizado em um matadouro-frigorífico com capacidade de abate de 96 cabeças por dia, no período de janeiro a abril de 2007. Foram colhidas 355 amostras de “swabs” de diferentes regiões da pele, imediatamente após o atordoamento, antes da sangria. A ocorrência de *E. coli* O157 no total analisado foi de 28,2%, sendo que na região das pernas foram obtidos os maiores percentuais, 11,3%, o que provavelmente ocorre pelo fato dos animais se deitarem, entrando em contato com fezes no piso do caminhão ou dos currais, ou pelo contato pelas próprias fezes quando defecam. A pele da maioria dos animais apresentava-se extremamente suja e a ocorrência do patógeno foi maior nessas amostras.

A ocorrência de *E. coli* O157:H7 em matadouros-frigoríficos bovinos foi registrada por BARHAM et al. (2002), em percentual de 45%, e por TUTENEL et al. (2003), de 56%. Variações nos resultados obtidos por outros autores com relação à ocorrência de *E. coli* O157 em pele bovina ocorrem, geralmente em função da amostragem, número de animais, superfície ou

região da pele analisada, a origem do animal, a quantidade de fezes na pele durante a coleta e a época do ano (NASTASIJEVIC et al., 2008).

A deposição das fezes dos animais no solo pode contaminar águas superficiais e, considerando que *E. coli* e *E. coli* O157:H7 conseguem se manter por longo período no esterco, os vegetais podem ser contaminados através da adubação orgânica. A contaminação de frutas e hortaliças pode ocorrer através da infiltração de águas residuais, regada com água contaminada, fertilização orgânica, presença de animais contaminados na propriedade. A contaminação também pode ocorrer nas operações de colheita, preparação para o mercado e distribuição, sendo a higiene dos funcionários fundamental para garantir a segurança, pois pode haver contaminação cruzada a partir de produtos contaminados ou a partir do manipulador portador da bactéria (ALMEIDA, 2005).

2.5 Caracterização molecular de *E. coli* e *E. coli* O157:H7

Métodos baseados na análise do genoma como “fingerprint” de DNA, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), análise de seqüências repetitivas do genoma e análise da região espaçadora entre os genes ribossomais (16S e 23S) através da técnica de PCR, Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE), oferecem a possibilidade de detecção de mínimas variações genéticas, permitindo a identificação de linhas clonais dentro das espécies (MARTINS, 2000).

A descoberta de que os genomas procarióticos continham seqüências repetitivas de DNA expandiu as metodologias de biologia molecular para estudos de variabilidade clonal em muitas espécies bacterianas, incluindo *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001). Algumas técnicas moleculares de tipagem baseadas em PCR utilizam “primers” homólogos a essas seqüências que, após a amplificação geram um perfil específico para cada amostra bacteriana (VERSALOVIC et al., 1991).

Três famílias de seqüências repetitivas de DNA são estudadas mais detalhadamente em *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001).

As “Seqüências Palindrômicas Extragênicas Repetitivas” (REP) possuem um número de cópias que varia de 500 a 1000 em *E. coli*, as “Seqüências Consensuais Intergênicas Repetitivas Enterobacterianas” (ERIC), entre 30 e 50 cópias em *E. coli* e o “Elemento BOX” (BOX), cujo número de cópias é semelhante ao observado nas seqüências ERIC de *E. coli* (MARTIN et al., 1992).

O número de cópias de seqüências ERIC varia com a espécie. Em *E. coli*, alguns autores estimam esse número em 30 cópias (DUCHAD et al., 2003), enquanto que outros relatam números variando de 30 a 50 (MARTIN et al., 1992). As seqüências ERIC diferenciam-se de outras seqüências repetitivas presentes em variadas espécies e foram primeiramente descritas em *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium e demais membros da família *Enterobacteriaceae*. Estão presentes apenas em regiões intergênicas, dentro de regiões transcritas (HULTON et al., 1991).

Segundo SILVEIRA et al. (2002), PFGE e RFLP estão entre as melhores técnicas de caracterização molecular, por apresentarem grande capacidade de diferenciação entre as amostras bacterianas analisadas, sendo também as metodologias mais usadas. Porém, exigem DNA em grande quantidade, são demoradas, requerem equipamentos caros e mão-de-obra especializada.

A técnica de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) tem sido utilizada no Japão desde 1996, quando foram registrados muitos surtos alimentares causados por *E. coli* O157:H7 (WATANABE et al., 1996). Atualmente é adotada como método de rotina para identificação desta bactéria nos laboratórios de pesquisa japoneses (PEI et al., 2007). No Japão, institutos de saúde municipais, centros de saúde, Ministério da Saúde e laboratórios passaram a trabalhar unidos para estudar EHEC (WATANABE et al., 2002) e, juntamente com outros sistemas internacionais, como a “Association of Public Health Laboratories” (Pulsenet), já identificaram surtos alimentares causados por *E. coli* O157:H7 neste país (TERAJIMA et al., 2002) e também Estados Unidos, além de auxiliarem no recolhimento de alimentos contaminados envolvidos em surtos (CDC, 2005).

Aproximadamente 2000 cepas de *E. coli* O157:H7 são identificadas anualmente no Japão, pela técnica de PFGE (PEI et al., 2007). Em estudo

conduzido por TERAJIMA et al. (2002) no Japão, pôde ser observado, em casos esporádicos, cepas indistinguíveis de *E. coli* O157:H7 pela técnica de PFGE. Por esta razão outros métodos de tipagem são requeridos para melhor discriminação entre os isolados (PEI et al., 2007).

Uma técnica de tipagem que pode ser utilizada em associação à técnica de PFGE é a “Análise de Múltiplos Locos do Número Variável de Repetições em Tandem” (MLVA), dado alto poder de discriminação de cepas de *E. coli* O157:H7 em estudo realizado por PEI et al. (2007).

JOHNSON et al. (1995) utilizaram a técnica de PFGE na investigação epidemiológica de dois surtos causados por *E. coli* O157:H7 em 1994 nos EUA, que envolveram dois estados. Um total de 12 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas das amostras de carne crua ou mal passada, coletadas nas casas de seis pacientes doentes que apresentavam a doença causada por *E. coli* O157:H7, foram comparadas com 26 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de amostras de fezes dos pacientes. Em 12 cepas isoladas de carne e 23/26 cepas isoladas de pacientes foi obtido o mesmo perfil, dividido em 20 fragmentos. Os perfis de PFGE obtidos para as amostras dos três outros pacientes foram diferentes entre si e também do perfil majoritário entre as amostras analisadas.

A técnica de REP-PCR é tida como uma metodologia extremamente confiável, reprodutível, rápida e de alta capacidade discriminativa (VERSALOVIC et al., 1994). Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de agarose, produzindo perfis referidos como “fingerprinting” genômico de Rep-PCR (VERSALOVIC et al., 1994). A técnica permite a diferenciação bacteriana em níveis de espécies, subespécies, e permite discriminar cepas de mesmo sorovar (RADEMAKER et al., 2003).

BROCCHI et al. (2006), objetivando realizar a tipagem em 49 amostras aviárias patogênicas de *E. coli* e 30 cepas de *E. coli* não-patogênicas pela técnica de REP-PCR, isoladas de aves de corte em diferentes surtos de septicemia, síndrome da cabeça inchada e onfalite, utilizaram a técnica de REP-PCR. Foram formados perfis que variavam de 0 a 15 bandas, com pesos moleculares entre 100pb e 6,1Kb. As 79 amostras foram separadas em 49 perfis distintos, não sendo discriminadas entre si cepas patogênicas de não-patogênicas. Os resultados do estudo mostraram ainda que apesar de a

técnica de REP-PCR ter alta capacidade de discriminação, não foi observado o agrupamento de amostras causadoras do mesmo tipo de doença.

Métodos de tipagem têm sido relatados como metodologias bastante consistentes para caracterizar cepas de *E. coli* de origem fecal no que se refere à fonte destas bactérias (GUAN et al., 2002). MOHAPATRA et al. (2007), objetivando diferenciar *E. coli* isoladas de fezes humanas, de animais domésticos e selvagens, que contaminavam as águas de quatro lagos em British Columbia, Canadá, utilizaram técnicas ERIC e BOX-PCR para realizar a caracterização molecular destes isolados. Foram analisadas 658 cepas isoladas no período de junho de 2004 a dezembro de 2005. Destas, 552 produziram perfis de alta qualidade, com 92% de similaridade. As cepas foram separadas em dois “clusters”, diferenciando as de fezes humanas das isoladas de animais. Além da capacidade de discriminação dos métodos de caracterização molecular utilizados, estes mostraram-se rápidos e práticos para determinação e identificação dos isolados de *E. coli* analisados.

MOHAPATRA (2008), objetivando diferenciar *E. coli*, de amostras de fezes de aves, utilizando a técnica de (GTG)₅, e compará-la às técnicas de ERIC, BOX e REP-PCR, isolaram 573 cepas de amostras coletadas através de “swabs”. Através da técnica de ERIC-PCR, foram obtidos os menores números de fragmentos, de quatro a 13. Tanto REP-PCR, quanto BOX-PCR produziram fragmentos que variavam de seis a 18. Utilizando a técnica de (GTG)₅, foram obtidos de dez a 25 fragmentos. As cepas foram separadas em dois grandes agrupamentos, onde foram diferenciadas cepas isoladas de aves domésticas das selvagens. O índice de similaridade obtido foi de 80%, e os resultados obtidos neste estudo mostraram que a técnica de (GTG)₅ é promissora para a rápida identificação de *E. coli* isolada em fontes contaminadas por fezes.

Em estudo similar, DOMBEK et al. (2000), objetivando diferenciar cepas de *E. coli* isoladas de fezes humanas e de animais em amostras da água de lagos em Minnesota, Estados Unidos, utilizaram as técnicas de REP e BOX-PCR para caracterização molecular de 208 cepas. Foram obtidos perfis em 125 isolados de *E. coli* pelas técnicas utilizadas. As de fonte humana se agruparam em quatro “clusters” que, no entanto, também incluíram duas cepas de aves aquáticas. Os outros isolados de fonte animal foram agrupados em quatro “clusters” diferentes. O índice de discriminação das técnicas utilizadas para

diferenciar cepas de *E. coli* de fonte humana, de vacas, ovelhas, patos, gansos foi de 93,8%.

A técnica de ERIC-PCR tem sido utilizada por vários autores como alternativa aos métodos de tipagem molecular convencionais para caracterizar enterobactérias, em especial *E. coli* de origem aviária, discriminando cepas não-patogênicas e patogênicas (SILVEIRA et al., 2002).

Utilizando a técnica de ERIC-PCR, VAN LITH & AARTS (1994) e MILLEMAN et al. (1996) discriminaram *Salmonella*, porém BURR et al (1998), utilizando os mesmos “primers” não conseguiram diferenciação dos sorotipos.

Dois estudos (JOHNSON & CLABOTS (2000) e JOHNSON et al. (2001)) mostram que elevadas temperaturas de anelamento combinadas ao uso de um “mix” comercial de PCR possibilitaram a capacidade de resolução e a reprodutibilidade dos “primers” ERIC2 e BOXA1R no rep-PCR. Objetivando avaliar as diferentes técnicas de rep-PCR para discriminação de *Salmonella* de fontes de fezes humanas e animais, RASSCHAERT et al. (2005) utilizaram as técnicas de ERIC-PCR, REP, BOX-PCR e (GTC)₅. Com os “primers” ERIC1R e ERIC2, foram obtidos perfis que variavam de 13 a 22 fragmentos, e foi observado que elevadas temperaturas de anelamento, superiores a 70°C não geraram nenhum fragmento ao utilizar o “primer” ERIC2. Com os “primers” REP1R e REP2I, foram formados perfis com cinco a 10 fragmentos, e a maioria bem fracos. Com o “primer” (GTC)₅ foram formados de 11 a 16 fragmentos. Com o “primer” BOXA1R os perfis consistiram em mais de 25 fragmentos, o que fez com que a comparação visual entre os perfis formados se tornasse muito difícil. O número máximo de bandas depende da resolução do sistema eletroforético; quanto maior a resolução, mais fragmentos podem ser separados e visualizados. Utilizando gel de agarose a 1,5%, a separação a 20 cm ao longo do gel, como usado neste estudo, o limite máximo foi de aproximadamente 20 fragmentos distintos. Com base no número como critério para seleção dos “primers”, foram consideradas a clareza das bandas e sua distribuição ao longo do perfil, bem como a capacidade de discriminação de cada “primer”. ERIC e (GTC)₅ foram escolhidos nas demais análises do trabalho. Utilizando os “primers” para ERIC, todos os perfis apresentaram um fragmento de 250pb e foram agrupadas em cinco clusters, com coeficiente de similaridade de 74%. Para o “primer” (GTC)₅ o coeficiente de similaridade

obtido foi de 83% e ao analisar os dois “primers”, ERIC e (GTC)₅, o coeficiente de similaridade foi de 80%.

Foram utilizadas as técnicas de REP, BOX e ERIC-PCR em experimento conduzido por NIKAM (2004), nos EUA, objetivando caracterizar molecularmente 52 cepas de *E. coli* de origem aviária e avaliar o desempenho destas técnicas. Os perfis de REP-PCR de *E. coli* apresentaram de um a 13 fragmentos, tendo sido verificado 100% de polimorfismo entre as cepas analisadas. Não foram observados fragmentos comuns entre os perfis obtidos. Pela técnica de BOX-PCR, os perfis que variavam de um a 11 fragmentos e, de forma semelhante ao observado com REP-PCR, o polimorfismo foi de 100%. Já por ERIC-PCR, foram obtidos perfis com dois a 13 fragmentos, tendo exibido também 100% de polimorfismo. Estes resultados mostraram a intensa heterogeneidade, ou diversidade genética, das cepas *E. coli* isoladas de aves.

Com o objetivo de detectar a diversidade genética entre 50 cepas de *E. coli* isoladas de aves com sinais de colibacilose e comparar os sorotipos O:H com a virulência das cepas, MOURA et al. (2001) utilizaram as técnicas de ERIC e REP-PCR, que mostraram grande capacidade de discriminação, revelando a extensa diversidade genética entre *E. coli* aviária. Através da técnica de ERIC-PCR foram obtidos perfis que variavam de oito a 17 fragmentos, e pela técnica de REP-PCR, perfis com seis a 20 fragmentos. As amostras foram agrupadas em quatro “clusters” principais, cada um com 60% de similaridade tanto por ERIC-PCR quanto por REP-PCR, correspondendo a cepas com diferentes graus de patogenicidade. Entretanto, 28/50 (56%) das cepas patogênicas foram agrupadas em dois grupos externos a três “clusters” principais e 86% das cepas não-patogênicas foram agrupadas em um “cluster” e um subgrupo. Os 32 sorotipos detectados foram distribuídos em todos os “clusters” com diferentes perfis genéticos, entretanto cepas do mesmo sorotipo tenderam a formar “clusters” com similaridade maior que 80%. Os resultados obtidos permitiram os autores concluir que nenhum sorotipo ou perfil genético específicos é responsável pela colibacilose.

JOHANSON & O'BRYAN (1999), avaliaram as técnicas de BOX e ERIC-PCR em diferentes condições de amplificação e desempenho das mesmas para verificar as relações genéticas em cepas de *E. coli* de uma coleção de cultura específica, a ECOR (“The *Escherichia coli* Reference

Collection”). Foram analisadas 15 cepas de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). As técnicas de ERIC e BOX-PCR apresentaram bons resultados para discriminação apenas das cepas do grupo filogenético A, não sendo eficientes para os demais grupos. Adicionalmente, o “primer” ERIC2 exibiu melhor capacidade de discriminação pela técnica de ERIC-PCR.

OSEK (2002) estudou a relação genética de cepas *E. coli* O157:H7 isoladas de suínos. De um total de sete isolados, quatro eram clones de um grupo, embora estes isolados tenham sido coletados em diferentes fazendas de criação de aves. BOX-PCR apresentou-se como uma técnica sensível o bastante para revelar diferenças genéticas entre *E. coli* O157:H7 de origem suína, além de ser uma ferramenta de diferenciação molecular rápida e conveniente para diferenciação de *E. coli* do mesmo sorogrupo.

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada para caracterização epidemiológica de 40 cepas enterotoxigênicas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia e 13 cepas isoladas do ambiente de criatórios suínos por COSTA et al. (2006). As amostras foram separadas em “clusters”, porém estes não eram relacionados aos fatores de virulência da bactéria, não tendo sido demonstrado o poder discriminatório esperado da técnica de ERIC-PCR, pelos autores.

Com o intuito de investigar a relação genética entre *E. coli* O157:H7 isolada de bovinos e de humanos na França, Itália e Espanha, GIAMMANCO et al. (2002) estudaram 57 cepas isoladas de casos de pessoas com síndrome urêmico-hemolítica e diarreia, de “swabs” coletados do reto de bovinos. Através da técnica de PFGE, foram obtidos 54 perfis que apresentavam de 13 a 22 fragmentos, que se agruparam em quatro “clusters”, apresentando alto poder de discriminação. Esta técnica também possibilitou a demonstração da transmissão horizontal de uma única cepa de *E. coli* O157:H7 isolada de duas fazendas, assim como a caracterização de isolados relacionados a surtos alimentares. Utilizando a técnica de ERIC-PCR neste estudo, três principais fragmentos e dois menores, de peso molecular entre 200 e 1300pb, foram observados em todos os perfis obtidos, independentemente da origem das cepas, o que tornou este método não adequado para distinguir epidemiologicamente cepas de *E. coli* O157:H7 não relacionadas entre si.

Em estudo conduzido por LING et al. (2000), 30 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de hamburguer de frango e bovino foram caracterizadas por ERIC-PCR. Cada isolado apresentou um perfil genético único, cujos fragmentos eram diferentes em cada perfil, mostrando polimorfismo entre os modelos estudados. A heterogenicidade genética de cepas *E. coli* O157:H7 obtida por ERIC-PCR neste estudo comprova a considerável variação genética de *E. coli* O157:H7.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Verificar a diversidade genética de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 em meias-carcaças bovinas através de técnica de ERIC-PCR.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os perfis de ERIC-PCR e sua distribuição em *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas.
- Verificar a distribuição dos perfis de ERIC-PCR das bactérias em estudo em dois matadouros-frigoríficos de grande porte de Goiânia.
- Verificar se a técnica constitui uma metodologia de tipagem satisfatória para caracterização epidemiológica de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 nas fontes em estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram analisadas 111 cepas sendo que 90 eram *E. coli* com sorovar não identificado e 21 cepas de *E. coli* O157:H7, isoladas em 2004 de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos de grande porte localizados em Goiânia-GO. As amostras estavam estocadas a -20°C em Caldo Luria-Bertani (LB) suplementado com 12% de glicerol.

Destas 90, 51 cepas de *E. coli* foram isoladas do matadouro-frigorífico A, enquanto que 39 cepas foram isoladas do matadouro-frigorífico B. No matadouro-frigorífico A, nove cepas pertenciam a três meias-carcaças quentes e 42 cepas pertenciam a sete meias-carcaças resfriadas. No matadouro-frigorífico B, dez cepas foram isoladas de quatro meias-carcaças resfriadas e 29 cepas foram isoladas de duas meias-carcaças quentes.

Do total de 21 cepas de *E. coli* O157:H7, 15 pertenciam ao matadouro-frigorífico A e seis cepas ao matadouro-frigorífico B. No matadouro-frigorífico A, *E. coli* O157:H7 foi isolada de três meias-carcaças quentes e de seis resfriadas, enquanto que no matadouro-frigorífico B, três cepas foram isoladas de uma meia-carcaça quente e as outras três cepas, de uma meia-carcaça resfriada.

Foi utilizado o par de oligonucleotídeos para *E. coli* O157:H7, com as seqüências (5' AAGCTCCGTGTGCCTGAA '3) e (5' GTAGGGAAGCGAACAGAG '3) (WANG et al., 1997), cujo gene-alvo é o *hlyA*.

4.2 ERIC PCR

- Extração do DNA

As culturas em estoque foram inoculadas em agar Mac Conkey para certificação da pureza e incubadas a 37°C/24h. Uma colônia lactose positiva de

cada placa foi inoculada em 5mL de Caldo LB e incubada a 37°C/18h em estufa BOD. Após este período, foi centrifugada a 10.000rpm/20min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 567µL de tampão tris EDTA (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) para extração do DNA genômico, realizado pela metodologia descrita por ALSUBEL et al. (1992) com algumas modificações (NUNES, 1999).

Após ser seco ao ar, o “pellet” de DNA obtido foi solubilizado em 100µL de tampão TE (pH 8,0) e armazenado a -20°C.

A qualidade e a concentração do DNA foram verificadas em gel de agarose a 0,8% em 0,5XTBE. A eletroforese foi realizada a 80V/1h, em tampão 0,5XTBE (pH 8,0). O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5mg/L) e visualizado em luz UV e posteriormente fotografado para documentação.

A partir das concentrações estimadas através de comparação visual com diluições do λ-DNA em concentrações conhecidas, foram preparadas diluições do DNA tampão TE (pH 8,0) de forma a se obter 100ng/5µL para amplificação.

- Reação de PCR

A técnica de ERIC-PCR foi realizada em conformidade com o proposto por VERSALOVIC et al. (1991). Para amplificação foi utilizado o par de “primers” ERIC1R (5'-ATGTAA GCT CCT GCG GAT TCA C-3') e ERIC2 (5'-AAF TAA GTG ACT GCG GTG AGC G-3') (INVITROGEN).

A mistura da reação consistiu em 100ng de DNA, tampão de PCR 1X, dNTP, Taq DNA Polimerase Recombinante Brasileira.

A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 95°C/7min, seguindo 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1min, anelamento a 52°C/1min e extensão a 65°C/8min.

Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em agarose a 1,2% com tampão 0,5 X TBE (pH 8,0), com corrida a 20V/15h. O gel foi corado com brometo de etídio (5mg/L), visualizado em luz UV e posteriormente fotografado para documentação.

O peso molecular (PM) dos fragmentos foi calculado com o programa “Quantity One”. Baseado no número e tamanho dos fragmentos foram estabelecidos os perfis. Variações na intensidade do fragmento não foram consideradas como fragmentos diferentes.

A construção do dendrograma foi feita a partir da introdução da matriz com os números equivalentes aos fragmentos de cada perfil no programa NTSYS. O coeficiente utilizado foi o de pareamento simples.

4.3 Análise estatística

O índice de discriminação (ID) da técnica foi calculado de acordo com o índice de diversidade de Simpson, conforme descrito por HUNTER & GASTON (1998).

As relações genéticas e as divergências e as divergências entre os perfis foram calculados a partir de uma matriz de distância genética, definida com base na semelhança entre os diferentes “fingerprints” e representada em um dendrograma construído com o método de análise “Neighbor-joining algorithm” (KUMAR et al., 1996).

Os dados obtidos nos diferentes perfis, no total de cepas, bem como em cada origem, foram submetidos à análise de variância (ANOVA “two-way”) e teste t de Student bi-caudal.

5. RESULTADOS

5.1 Perfis de ERIC-PCR em *E. coli*

Os perfis foram identificados com a letra P seguida do número. Deve-se ressaltar que, embora tenham sido identificados 40 perfis, no total analisado, designados de P1 a P40, os obtidos em *E. coli* O157:H7 serão tratados no item 5.2.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos perfis de ERIC-PCR de *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas. Pode-se observar que as 90 amostras analisadas distribuíram-se em 32 perfis, tendo sido verificadas duas não-tipáveis (NT).

No total da amostragem foram obtidas frequências de ocorrência que variaram de 1,11% a 12,22% nos diferentes perfis. Assim, os perfis P1 e P2 foram apresentados por 11/90 (12,22%) amostras, cada, P9 em 03/90 (3,33%), P10 e P11 em 02/90 (2,22%), cada, P5 e P6 em 05/90 (5,55%), cada, e os perfis P23, P27 e P36 em 01/90 (1,11%), cada.

TABELA 1 – Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas. Goiânia, 2008

PERFIS DE ERIC-PCR	N.	%
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS		
P1	11/90 ¹	12,22
P2	11/90	12,22
P18	01/90	1,11
P19	01/90	1,11
P9	03/90	3,33
P10	02/90	2,22
P11	02/90	2,22
P5	05/90	5,55
P21	01/90	1,11
P22	01/90	1,11
P12	02/90	2,22
P13	02/90	2,22
P23	01/90	1,11
P14	02/90	2,22
P25	01/90	1,11
P6	05/90	5,55
P27	01/90	1,11
P15	02/90	2,22
P32	01/90	1,11
P33	01/90	1,11
P36	01/90	1,11
P7	04/90	4,44
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES		
P8	03/90	3,33
P3	08/90	8,88
P16	02/90	2,22
P4	07/90	7,77
P26	01/90	1,11
P30	01/90	1,11
P35	01/90	1,11
P38	01/90	1,11
P17	02/90	2,22
P39	01/90	1,11
NT	02/90	2,22

1. Número de cepas pertencentes ao perfil sobre o total de cepas analisadas

A Tabela 2 apresenta a distribuição dos perfis de ERIC-PCR no total de amostras de *E. coli* isoladas no total de superfícies de meias-carcaças. As amostras de *E. coli* isoladas de meias-carcaças resfriadas se distribuíram

em 22 perfis, enquanto que as quentes em dez, devendo-se observar que duas cepas não-tipáveis foram identificadas.

Nas amostras isoladas de meias-carcaças resfriadas, foram observadas frequências de ocorrência variando de 1,64% a 18,03% nos diferentes perfis. Assim, P1 e P2 foram apresentados por 11/61 (18,03%), cada, P5 e P6 em 05/61 (8,20%), P7 em 04/61 (6,56%), P9 em 03/61 (4,92%), 02/61 (3,28%) classificaram nos perfis P10, P11, P12, P13, P14, P15, enquanto que nos perfis P18, P19, P21, P22, P23, P25, P27, P32, P33, P36 foi verificada a ocorrência de 01/61 (1,64%) amostra cada.

Já nas amostras de *E. coli* isoladas de meias-carcaças quentes foram obtidos percentuais variando de 3,45% a 27,59% nos diferentes perfis, tendo sido observado o predomínio do P3, descrito em 08/29 (27,59%), seguindo-se o P4, em 07/29 (24,14%), o P8 em 03/29 (6,90%), enquanto que o 01/29 (3,45%) se distribuíram nos perfis P26, P30, P35, P38 e P39.

TABELA 2 Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas. Goiânia, 2008

PERFIS	N.	%
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS		
P1	11/55 ¹	20,0
P2	11/55	20,0
P18	01/35	2,85
P19	01/35	2,85
P9	03/55	5,45
P10	02/55	3,63
P11	02/55	3,63
P5	05/55	9,09
P21	01/35	2,85
P22	01/35	2,85
P12	02/35	5,71
P13	02/35	5,71
P23	01/55	1,81
P14	02/55	3,63
P25	01/55	1,81
P6	05/55	9,09
P27	01/55	1,81
P15	02/35	5,71
P32	01/35	2,85
P33	01/55	1,81
P36	01/55	1,81
P7	04/35	11,42
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES		
P8	03/35	8,57
P5	08/35	7,77
P16	02/35	5,71
P30	01/35	2,85
P4	07/55	12,72
P26	01/55	1,81
P35	01/35	2,85
P38	01/35	2,85
P17	02/35	5,71
P39	01/55	1,81
NT	02/35	5,71

1. Número de cepas pertencentes ao perfil sobre o total de cepas analisadas

Na Tabela 3 podem ser verificados os perfis de ERIC-PCR obtidos no total de amostras de *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas de cada matadouro-frigorífico. As isoladas de

superfícies de meias-carcaças dos matadouros-frigoríficos A e B se distribuíram em 16 perfis.

TABELA 3 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, segundo o matadouro-frigorífico. Goiânia, 2008

PERFIL	N.	%	N.*	%*
MATADOURO-FRIGORÍFICO A			TOTAL	
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
P4	07/09	77,78	07/55	12,72
P26	01/09	11,11	01/55	1,81
P39	01/09	11,11	01/55	1,81
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
P1	11/46	23,91	11/55	20,0
P2	11/46	23,91	11/55	20,0
P9	03/46	6,52	03/55	5,45
P10	02/46	4,35	02/55	3,63
P11	02/46	4,35	02/55	3,63
P5	05/46	10,87	05/55	9,09
P23	01/46	2,17	01/55	1,81
P14	02/46	4,35	02/55	3,63
P25	01/46	2,17	01/55	1,81
P6	05/46	10,87	05/55	9,09
P27	01/46	2,17	01/55	1,81
P33	01/46	2,17	01/55	1,81
P36	01/46	2,17	01/55	1,81
MATADOURO-FRIGORÍFICO B			TOTAL	
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
P8	03/20*	15,00	03/35*	8,57
P3	08/20	40,00	08/35	22,85
P16	02/20	10,00	02/35	5,71
P30	01/20	5,00	01/35	2,85
P35	01/20	5,00	01/35	2,85
P38	01/20	5,00	01/35	2,85
P17	02/20	15,00	02/35	5,71
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
P18	01/15	6,67	01/35	2,85
P19	01/15	6,67	01/35	2,85
P21	01/15	6,67	01/35	2,85
P22	01/15	6,67	01/35	2,85
P12	02/15	13,33	02/35	5,71
P13	02/15	13,33	02/35	5,71
P15	02/15	13,33	02/35	5,71
P32	01/15	6,67	01/35	2,85
P7	04/15	26,67	04/35	11,42

*Relação às amostras totais no determinado Frigorífico

**Consideram-se 2 amostras NT (não tipáveis) no total de isolados de meias-carcaças quentes

No Quadro 1 está descrita, detalhadamente, a distribuição dos perfis de ERIC-PCR de *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, nos matadouros-frigoríficos A e B, enquanto que nos Quadros 2 e 3 pode-se acompanhar a distribuição dos perfis de *E. coli* obtidos individualmente nas meias-carcaças positivas para *E. coli* nos matadouros-frigoríficos A e B.

Considerando o total de amostras de *E. coli* isoladas de meias-carcaças quentes do matadouro-frigorífico A, os 16 perfis foram obtidos em percentuais que variaram de 1,81% a 20%, devendo-se ressaltar que P1 e P2 foram apresentados por 11/55 (9,09%), cada. Os demais apresentaram-se distribuídos em um número menor de amostras.

Ainda na Tabela 3 verifica-se que as amostras isoladas de superfície de meias-carcaças quentes do matadouro-frigorífico A, se classificaram em três perfis com o predomínio do P4, descrito em 07/99 (77,78%) amostras, enquanto que P26 e P39 foram verificadas em 01/09 (11,11%).

Já nas amostras isoladas de superfície de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico A foram obtidos 13 perfis, com percentuais variando de 2,17% a 23,91%. Foi observado o predomínio dos perfis P1 e P2, exibidos em 11/46 (23,91%) amostras de *E. coli*, seguido dos perfis P5 e P6 em 05/46 (10,87%) cada, P9 em 03/46 (6,52%), enquanto que os perfis P10, P11 e P14 em 02/45 (4,35%) cada, e 01/46 (2,17%) se distribuíram nos perfis P23, P25, P27, P33 e P36.

Quanto ao total de amostras isoladas de superfície de meias-carcaças do matadouro-frigorífico B, pode-se verificar, na Tabela 3, que nos 16 perfis obtidos foram observados percentuais variando de 2,85% a 11,42% e o predomínio dos perfis P3 e P7, apresentados por 08/35 (22,85%) e 04/35 (11,42%) amostras, respectivamente. Os demais consistiram em perfis de menor ocorrência, devendo-se observar que duas amostras foram não-tipáveis.

As amostras isoladas de meias-carcaças quentes do matadouro-frigorífico B se classificaram em sete perfis e seus respectivos percentuais variaram de 5% a 40%. Foi observado o predomínio do perfil P3, em 08/20

(40%), enquanto que P8 foi apresentado por 03/20 (15%), P16 e P17 em 02/20 (10%) e 01/20 (5%) se distribuíram os perfis P30, P35 e P38.

Já as amostras isoladas de meias-carcaças resfriadas deste mesmo estabelecimento apresentaram nove perfis distribuídos em percentuais variando de 6,67% a 26,67%. Foi observado predomínio do perfil P7, descrito em 04/15 (26,67%) amostras. Os perfis P12, P13 e P15 foram exibidos por 02/15 (13,33%) e 01/15 (6,67%) se distribuíram nos perfis P18, P19, P21, P22 e P32.

Foram obtidos seis perfis com seis e 13 fragmentos, três com 15, 16 e quatro fragmentos, quatro perfis com 12 e oito fragmentos, dois perfis com 18 e dois fragmentos, um perfil com 14, nove, sete, cinco e um fragmento.

QUADRO 1 Perfis de ERIC-PCR em *E. coli* isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, nos matadouros-frigoríficos A e B. Goiânia, 2008

FONTE	PERFIL	
	N. PERFIS	PERFIS
TOTAL DE MEIAS-CARCAÇAS (14) ^{1,3} (90) ²	32	P1(3) ⁴ , P8(1), P2(4), P18(1), P3(1), P19(1), P9(1), P10(1), P11(1), P5(1), P21(1), P22(1), P16(1), P12(1), P13(1), P4(1), P23(1), P14(1), P24(1), P25(1), P6(1), P26(1), P27(1), P30(1), P15(1), P32(1), P33(1), P35(1), P36(1), P38(1), P17(1), P39(1), P7(1). NT(1)
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES (5) (38)	15	P8(1), P18(1), P3(1), P19(1), P16(1), P13(1), P4(1), P25(1), P26(1), P30(1), P31(1), P35(1), P38(1), P17(1), P39(1), P7(1)
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS (11) (52)	17	P1(3), P2(4), P9(1), P10(1), P11(1), P5(1), P21(1), P22(1), P12(1), P23(1), P14(1), P6(1), P27(1), P15(1), P32(1), P33(1), P36(1)
MATADOURO-FRIGORÍFICO A		
MEIAS-CARCAÇAS (9) ^{1,3} (51) ²	13	P1(3), P2(4), P9(1), P10(1), P11(1), P5(1), P4(1), P6(1), P26(1), P27(1), P36(1), P37(1), P39(1)
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES (3) (9)	3	P4(1), P26(1), P39(1)
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS (7) (42)	10	P1(3), P2(4), P9(1), P10(1), P11(1), P5(1), P23(1), P6(1), P27(1), P36(1)
MATADOURO-FRIGORÍFICO B		
MEIAS-CARCAÇAS (5) ^{1,3} (39) ²	19	P8(1), P18(1), P3(1), P19(1), P21(1), P22(1), P16(1), P12(1), P13(1), P14(1), P25(1), P30(1), P15(1), P32(1), P33(1), P35(1), P38(1), P17(1), P7(1)
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES (2)	12	P8(1), P18(1), P3(1), P19(1), P16(1), P13(1), P25(1), P30(1), P35(1), P38(1), P17(1), P7(1), NT(1)
RESFRIADAS (4) (10)	7	P21(1), P22(1), P12(1), P14(1), P15(1), P32(1), P33(1)

1. Número de meias-carcaças positivas para *E. coli*
2. Número total de isolados submetidos do ERIC-PCR
3. Presença de uma mesma meia-carcaça positiva quente e resfriada
4. Número de meias-carcaças pertencentes ao perfil

5.2 Perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7

Os perfis de *E. coli* O157:H7 foram identificados com as letras PP seguidas do número. Na Tabela 4 podem ser verificados os perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7 no total analisado e nas amostras isoladas de superfície de meias-carcaças nos dois matadouros-frigoríficos. Foram obtidos quatro perfis de *E. coli* O157:H7 nas meias-carcaças quentes e nas resfriadas, ressaltando-se que cinco não-tipáveis foram verificadas nestas últimas.

Considerando os dados obtidos na Tabela 4, verifica-se que no total de amostras isoladas de superfícies de meias-carcaças do matadouro-frigorífico A, as 15 cepas analisadas se distribuíram em seis perfis, em percentuais variando de 6,67% a 40,02%, tendo predominado o perfil PP1, apresentado por 06/15 (40,02%) e os demais foram de menor ocorrência. O perfil PP3, em 02/12 (16,67%) e PP4, em 01/12 (8,33%). Nas isoladas das resfriadas, os perfis PP1, PP3 e PP4 foram exibidos em 06/12 (50%), 02/12 (16,67%) e 01/12 (8,33%), respectivamente.

Quanto ao total de amostras de *E. coli* O157:H7 isoladas em superfícies de meias-carcaças do matadouro-frigorífico B, as seis analisadas se distribuíram nos perfis PP2 e PP5, com predomínio do primeiro, apresentado por 03/06 (60%) amostras, notando-se que as demais foram não-tipáveis. Já o perfil PP5 foi exibido por 01/06 (16,67%) amostra.

No Quadro 4 está descrita, detalhadamente, a distribuição dos perfis de ERIC-PCR de *E. coli* O157:H7 isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, nos matadouros-frigoríficos A e B, enquanto que nos Quadros 2 e 3 pode-se acompanhar a distribuição dos perfis de *E. coli* O157:H7 obtidos individualmente nas meias-carcaças positivas para *E. coli* O157:H7 nos matadouros-frigoríficos A e B.

No total de amostras de *E. coli* O157:H7 analisadas, os perfis PP6, PP7, PP8 e PP5 foram apresentados pelas isoladas de meias-carcaças quentes, enquanto que PP1, PP3, PP4 e PP2 apenas nas resfriadas. Forma semelhante ao verificado com os perfis de *E. coli* O157:H7, que mostraram-se exclusivos a este sorovar e também foram específicos de cada fonte.

TABELA 4 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7 isoladas de superfície de meias-carcaças bovinas. Goiânia, 2008

PERFIL	N.	%	N.*	%*
MATADOURO-FRIGORÍFICO A			TOTAL	
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
PP6	01/03	33,33	1/15	6,67
PP7	01/03	33,33	1/15	6,67
PP8	01/03	33,33	1/15	6,67
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
PP1	06/12**	50,00	06/15	40,02
PP3	02/12	16,67	02/15	13,34
PP4	01/12	8,33	01/15	6,67
MATADOURO-FRIGORÍFICO B			TOTAL	
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
PP5	01/01	100,00	01/06	16,67
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
PP2	03/05***	60,00	03/06	50,00

*Relação às amostras totais no determinado Frigorífico

**Consideram-se 3 amostras NT (não-tipáveis) no total de isolados de meias-carcaças resfriadas

***Consideram-se 2 amostras NT (não-tipáveis) no total de isolados de meias-carcaças resfriadas

QUADRO 2 – Identificação das amostras de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e os perfis de ERIC-PCR obtidas. Goiânia, 2008

MEIAS-CARCAÇAS	AMOSTRA	PERFIL ERIC
QUENTES	16 Q 10-1 C n1	P4
	16 Q 10-1 C n2	P4
	16 Q 10-1 A n1	P4
	16 Q 10-1 C n2	P4
	16 Q 10-1 C n1	P4
	16 Q 10-1 A n1	P4
	16 Q 10-1 A n2	P4
	16 Q 10-2 A n3	PP7
	17 Q 2 C n1	PP6
	71 Q 2 A n1	PP8
	73 Q 2 A n2	P39
	19 Q 2 C n2	P26
RESFRIADAS	18 F 10-2 T1 B n1	P5
	18 F 10-2 T1 B n2	P10
	18 F 10-2 T1 A n1	P10
	18 F 10-1 T1 D n1	P5
	18 F 10-2 T1 B n1	P11
	18 F 10-2 T1 B n1	P11
	18 F 10-2 C n1	P5
	18 F 10-2 C n2	P5
	18 F 10-2 T1 A n1	P5
	18 F 10-2 T1 D n3	NT
	18 Fo B n2	P27
	19 F 2 B n2	PP3
	19 F 2 n2	P6
	19 F 10-1 C n1	P6
	19 F 10-1 C n2	P6
	19 F 10-1 C n3	PP3
	19 F 2 B n1	P6
	19 F 2 B n2	P6
	28 F 10-3 T2 B n2	PP1
	28 F 10-2	PP4
	28 F 10-3	P2
	28 F 10-3	P2
	28 F 10-3	P2
	28 F 10-3 T1 C n2	P23
	28 F 10-3 T1 E n1	P2
	28 F 10-3 T1 E n2	P1
	28 F 10-1 T1 C n1	P1
	28 F 10-1 T1 C n2	P2
	28 F 10-1 T1 C n3	P1
	28 F 10-3 T2 B n1	P1
	28 F 10-3 T2 B n2	P1
	28 F 10-1 T1 B n2	P1
	28 F 10-1 T1 C n1	P1
	28 F 10-1 T1 C n2	P1
	28 F 10-1 T1 C n1	P2

Continua...

Continuação.

QUADRO 2 – Identificação das amostras de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e os perfis de ERIC-PCR obtidas. Goiânia, 2008

MEIAS-CARCAÇAS	AMOSTRA	PERFIL ERIC
	29F 10-2 T1 B n1	PP1
	29 F 10-3 T2 E n1	PP1
	29F 10-2 T1 n2	PP1
	29F 10-2	PP1
	29F 10-1 T1A n1	P2
	29 F 10-1 T1 A n2	P2
	29 F 10-1 T1 B n1	PP1
	29 F 10-1 T1 B n2	P1
	29 F 10-2 T1 A n1	P1
	48 F 10-1 B n2	P2
	48 F 10-1 C n1	NT
	48F 10-1 A	P36
	61 F2 E n2	P9
	61 F2 n1	P9
	61 F2 B' n1	P9
	63F 63 F2 A	NT
	66 F2 D n1	P2
	66 F2 A n2	P2
	66 F2 E n1	P1

**E. coli* O157:H7 assinaladas em Vermelho.

QUADRO 3 – Perfis de ERIC-PCR em *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas do matadouro-frigorífico B. Goiânia, 2008

MEIAS-CARCAÇAS		AMOSTRA	PERFIL
QUENTES	8Q	8 Q A n2	P30
	41Q	41 Q2 A n2	P3
		41 Q2 A n3	P 17
		41 Q2 C n2*	PP5
		41 Q2 A n1	P 17
		41 Q2 A n1	P38
		41 Q2 A	P3
		41 Q2 A	P3
		41 Q2 A	P3
		41 Q2 A	P3
		41 Q2 A n2	NT
		41 Q2 A n3	P3
		41 Q2 B	NT
		41 Q2 B n2	P8
		41 Q2 B' n1	P8
		41 Q2 B' n2	P8
		41 Q2 A n1	P16
		41 Q2 A n2	P3
		41 Q2 A n2	P16
		41 Q2 C n1	P35
		41 Q B	NT
		41 Q B	NT
		41 Q2 A n2	P3
RESFRIADAS	41F	41 F2 C n2	P7
		41 F2 C n2	P7
		41 F2 B n1	P7
		41 F2 A n1	P7
		41 F2 A n3	P25
		41 F2 A n3	P18
		41F2 (B)	P13
		41F2 A	P13
		41 F2 B n2	P19
	44F	44 F2 A n2	P32
	45F	45F2 (B)	PP2
		45F2 (B)	PP2
		45 F2 B	PP2

**E. coli* O157:H7 assinaladas em Vermelho.

QUADRO 4 - Distribuição dos perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7 de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas, segundo o matadouro-frigorífico. Goiânia, 2008

FONTE	PERFIS	
	N. PERFIS	PERFIS
TOTAL DE MEIAS-CARCAÇAS (11) ¹ (21) ²	8	PP1(2) ³ , PP2(1), PP3(1), PP6(1), PP7(1), PP4(1), PP8(1), PP5(1), NT(4)
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES (4) (6)	4	PP6(1), PP7(1), PP8(1), PP5(1), NT(3)
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS (7) (15)	4	PP1(2), PP2(1), PP3(1), PP4(1), NT(3: 18F, 48F, 63F)
MATADOURO-FRIGORÍFICO A		
MEIAS-CARCAÇAS (10) (10)	6	PP1(2), PP3(1), PP6(1), PP7(1), PP4(1), PP8(1), NT(3)
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES (4) (3)	3	PP6(1), PP7(1), PP8(1)
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS (6) (7)	3	PP1(2), PP3(1), PP4(1), NT(3)
MATADOURO-FRIGORÍFICO B		
MEIAS-CARCAÇAS (6) (2)	2	PP2 (1), PP5(1), NT(1)
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES (3) (1)	1	PP5(1), NT(1)
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS (3) (1)	1	PP2 (1)

1. Número total de meias-carcaças positivas para *E. coli* O157:H7

2. Número total de cepas tipadas

3. Número de meias-carcaças positivas

5.3 Relações genéticas entre as amostras de *E. coli* e *E. coli* O157:H7

Visando estabelecer as relações genéticas existentes entre as amostras, foi utilizado o coeficiente de pareamento simples para a análise dos dados, tendo sido construído um dendrograma de similaridade (Figura 1) a partir dos 40 perfis gerados nas amostras de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de 20 meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B.

A similaridade entre os 40 perfis de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 variou de 73,60% a 97,70%.

Os perfis foram divididos em dois grupos, GI e GII, com similaridade acima de 73,60%. O Grupo GII foi representado apenas por um perfil P22, representado por cinco cepas de *E. coli* isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico A.

O grupo GI foi dividido em dois subgrupos, GI.1 e GI.2, com similaridade de 75,60%, no qual o perfil GI.2 foi representado apenas pelo perfil P40, com total de quatro cepas de *E. coli* isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico B. O subgrupo GI.1 foi dividido em três “clusters”, A, B e C, com similaridade de 77,30% para os dois primeiros e de 76,80% para o C.

O “cluster” C foi dividido em um “subcluster”, representado pelos perfis P30, P31, P215 e P33, com similaridade de 84,30%. Estes perfis correspondem a meias-carcaças quentes e resfriadas do matadouro-frigorífico A. Já o “cluster” B também foi dividido por um “subcluster”, com similaridade de 85,50%, representado pelos perfis P10, P11 e P5, com total de nove cepas, todas isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico A.

As amostras que formam os perfis agrupados em GI, GII, GI.2, GI.1 e os “clusters” B e C representam apenas 27,93% das amostras. O restante, 72,07%, está agrupado no “cluster” A, o qual engloba um clone.

O “cluster” A foi dividido em três “subclusters”, A1, A2 e A3, com similaridade de 80,80%, sendo que os dois últimos foram representados por um perfil cada, P18 e P2, respectivamente.

O “subcluster” A1 foi subdividido em dois novos agrupamentos, A1.1 e A1.2, com similaridade de 81,50%.

Quando analisados apenas os perfis gerados nas amostras de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B, pode-se observar as relações genéticas existentes entre as mesmas, como mostrado na Figura 2. Neste dendrograma de similaridade também foi utilizado o coeficiente de pareamento simples para a análise dos dados.

A similaridade entre os sete perfis de *E. coli* O157:H7 variou de 78,00% a 93,00%.

Os perfis foram divididos em dois grupos, GRI e GRII, com similaridade de 79,80%. O Grupo GRII foi representado pelos perfis P28 e P31, identificados por cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças resfriadas e quentes, respectivamente, do matadouro-frigorífico A. A similaridade entre estes perfis foi de 83,70%.

O grupo GRI foi dividido em dois subgrupos, GRI.1 e GRI.2, com similaridade de 80,70%. O subgrupo GRI.1 foi representado apenas pelo perfil PP5, identificado em uma meia-carcaça quente do matadouro-frigorífico B. O subgrupo GRI.2 foi dividido em dois “clusters”, GR.a e GR.b, com similaridade de 84,00%, no qual o perfil GR.b foi representado apenas pelo perfil PP2, com total de três cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico B. O “cluster” GR.a foi dividido em dois “subclusters”, C e D, com similaridade de 86,40% para o C, representado apenas pelo perfil PP8, e de 87,20% para o D.

O “cluster” D foi novamente dividido em um agrupamento, representado pelos perfis PP1 e PP6, com similaridade de 93,00%. Estes perfis correspondem a meias-carcaças resfriadas e quentes, respectivamente, do matadouro-frigorífico B.

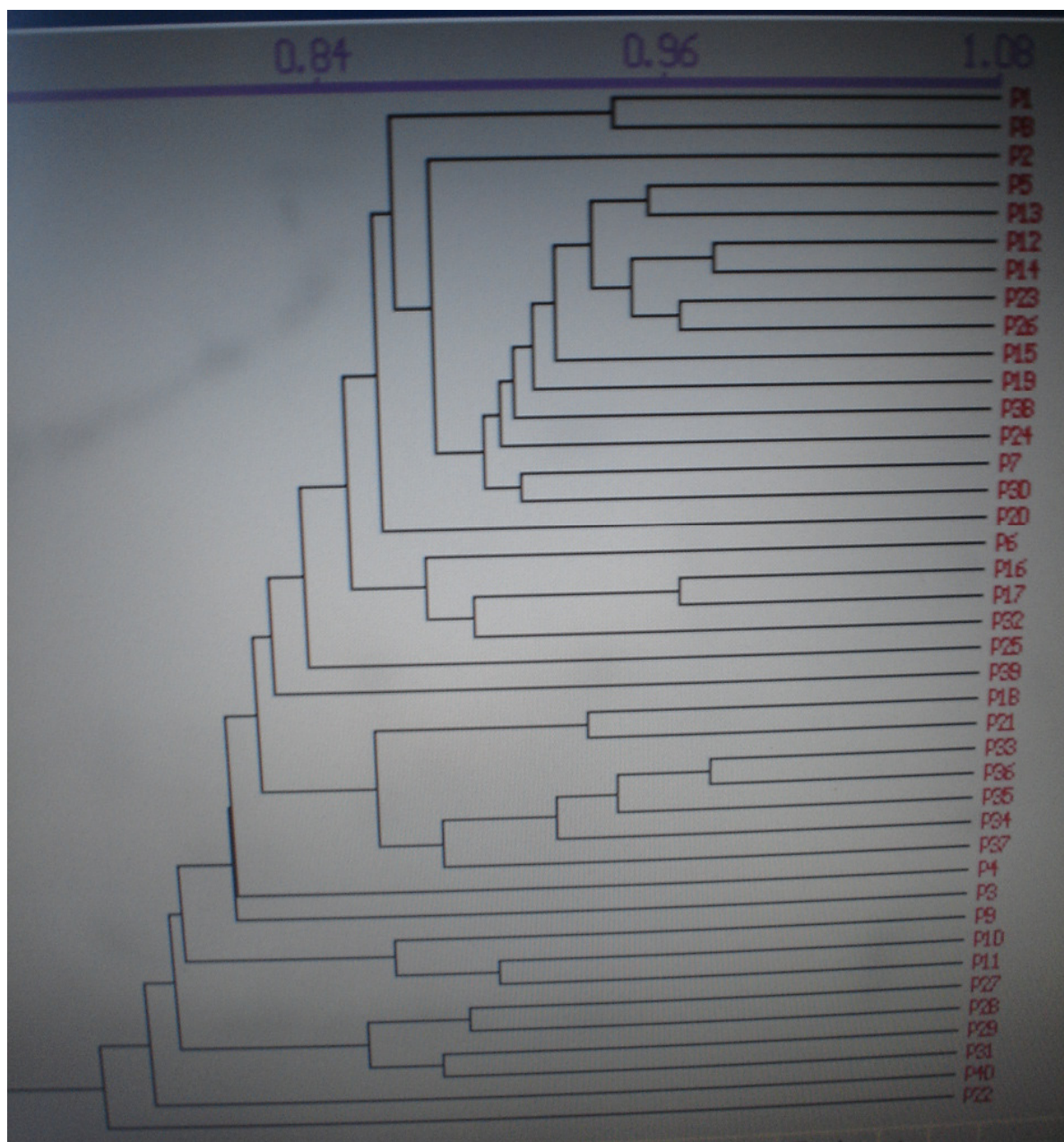


FIGURA 1 - Dendrograma obtido pela técnica de ERIC-PCR em cepas de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B. Goiânia, 2008

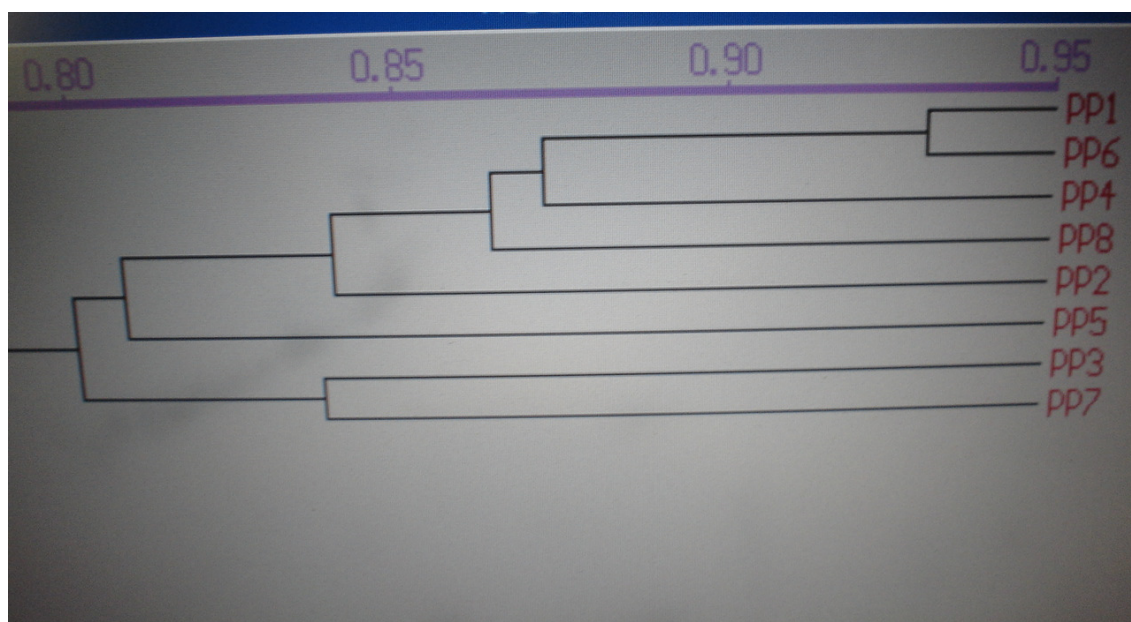


FIGURA 2 - Dendrograma obtido pela técnica de ERIC-PCR em cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B. Goiânia, 2008

6. DISCUSSÃO

6.1 Perfis de ERIC-PCR em *E. coli*

A discriminação obtida com a técnica de ERIC-PCR foi bastante satisfatória no total analisado de *E. coli* e *E. coli* O157:H7, independente do sorovar, com Índice de Discriminação (ID) de 0,959. No entanto a técnica não conseguiu caracterizar a totalidade da amostragem, pois 23,81% das 101 amostras não puderam ser tipadas e este percentual é elevado.

A técnica de ERIC-PCR das amostras de *E. coli* apresentou um ID de 0,948, indicando a elevada capacidade de discriminação da técnica para a espécie analisada. Já o ID apenas de *E. coli* O157:H7 foi de 0,841, indicando uma eficiência menor para caracterização deste sorovar na amostragem analisada.

Com relação ao matadouro-frigorífico A, o ID obtido, independente do sorovar, foi de 0,921. Este índice passou a 0,894 considerados os resultados do ERIC para *E. coli* e para 0,757 quando *E. coli* O157:H7 foi considerada isoladamente. No matadouro-frigorífico B, o ID entre *E. coli* O157:H7 foi baixo, de 0,5, o que pode ser explicado pelo fato de serem poucas cepas positivas para *E. coli* O157:H7, sendo que cinco delas eram não-tipáveis. Além disso as 16 cepas tipadas foram distribuídas em apenas oito perfis.

Resultados obtidos no presente estudo concordam com os de MOHAPATRA et al. (2007), que verificaram a alta capacidade de discriminação dos métodos de caracterização molecular utilizados, como ERIC, BOX e REP-PCR na determinação e identificação de *E. coli* isoladas de fezes humanas, animais domésticos e selvagens no Canadá.

De forma semelhante, são corroborados pelos de MOURA et al. (2001) que também utilizaram as técnicas de ERIC e REP-PCR, tendo as mesmas apresentado elevada capacidade de discriminação. Estes autores, assim como no presente trabalho, verificaram a extensa diversidade genética em cepas de *E. coli*, porém em *E. coli* aviária.

Na discriminação de *Salmonella*, a técnica de ERIC-PCR foi utilizada com sucesso por VAN LITH & AARTS (1994) e por MILLEMAN et al. (1996),

porém BURR et al. (1998), utilizando os mesmos “primers” não conseguiram diferenciação dos sorotipos, ao contrário do que se verificou neste trabalho, onde foi observada a distribuição das amostras em perfis únicos.

Foi observado que os perfis obtidos mostraram-se exclusivos de cada fonte. No matadouro-frigorífico A, o número total de perfis obtidos de ERIC-PCR de *E. coli* foi de 16, quando analisado um total de 51 cepas. No matadouro-frigorífico B, o número total de perfis obtidos foi de 17, quando analisado um total de 39 cepas.

Pôde ser observado também que foram encontrados diferentes perfis de ERIC-PCR de *E. coli* isoladas de uma mesma meia-carcaça.

Em estudo realizado por MOHAPATRA et al., 2007, foram formados dois “clusters”, onde pôde-se diferenciar as cepas de *E. coli* de fezes humanas das cepas isoladas de animais. Já no presente estudo foram formados três “clusters”, mas estes não foram completamente separados em cepas de um mesmo matadouro-frigorífico ou diferenciados em cepas isoladas de meias-carcaças quentes ou resfriadas. Foi observado também que formaram-se vários agrupamentos diferentes entre as cepas de *E. coli* O157:H7.

Em estudo realizado por DOMBEK et al. (2000), foram utilizadas as técnicas de REP e BOX-PCR para caracterização molecular de 208 cepas de *E. coli* isoladas de fezes humanas e de animais. Foram obtidos perfis em 125 isolados de *E. coli*, sendo que as cepas de fonte humana se agruparam em quatro “clusters” que, no entanto, também incluíram duas cepas de aves aquáticas. Os outros isolados de fonte animal foram agrupados em quatro “clusters” diferentes. O índice de discriminação das técnicas utilizadas para diferenciar cepas de *E. coli* de fonte humana, de vacas, ovelhas, patos, gansos foi de 93,8%, também inferior ao obtido no presente trabalho.

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada para caracterização epidemiológica de 40 cepas enterotoxigênicas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia e 13 cepas isoladas do ambiente de criatórios suínos por COSTA et al. (2006). As amostras foram separadas em “clusters”, porém estes não eram relacionados aos fatores de virulência da bactéria, não tendo sido demonstrado o poder discriminatório esperado da técnica de ERIC-PCR pelos autores, contrastando com os resultados aqui descritos.

6.2 Perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7

Foram oito perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B. O índice de discriminação entre essas cepas foi de 0,841, um pouco menor que o obtido para *E. coli* provavelmente em função do reduzido número de cepas de *E. coli* O157:H7 analisadas e de terem sido analisadas várias isoladas um uma mesma amostra.

OSEK (2002), utilizando a técnica de BOX-PCR para relacionar geneticamente cepas *E. coli* O157:H7 isoladas de suínos, obteve bons resultados uma vez que a metodologia apresentou-se como uma técnica sensível o bastante para revelar diferenças genéticas entre *E. coli* O157:H7 de origem suína, além de ser uma ferramenta de diferenciação molecular rápida e conveniente para diferenciação de *E. coli* do mesmo sorogrupo.

6.3 Relações genéticas

Neste estudo, o número de fragmentos formados pela técnica de ERIC-PCR para *E. coli* e *E. coli* O157:H7 variou de um a 18.

Através da técnica de ERIC-PCR utilizada em estudo realizado por MOHAPATRA (2008), os perfis obtidos de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de aves, foram obtidos perfis com quatro a 13 fragmentos, enquanto que pelas técnicas de REP-PCR e BOX-PCR, foram formados perfis que apresentavam de seis a 18 fragmentos. Através da técnica de (GTG)₅, foram obtidos de dez a 25 fragmentos.

Em estudo realizado por NIKAM (2004), os perfis de REP-PCR de *E. coli* isoladas de aves apresentaram de um a 13 fragmentos, tendo sido verificado 100% de polimorfismo entre as cepas analisadas. Não foram observados fragmentos comuns entre os perfis obtidos. Pela técnica de BOX-PCR, os perfis que variavam de um a 11 fragmentos e, de forma semelhante ao observado com REP-PCR, o polimorfismo foi de 100%. Já por ERIC-PCR,

foram obtidos perfis com dois a 13 fragmentos, tendo exibido também 100% de polimorfismo. Estes resultados mostraram a intensa heterogeneidade, ou diversidade genética, das cepas *E. coli* isoladas de aves.

LING et al. (2000) também observaram a heterogeneidade genética de cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de hambúrguer de frango e bovino. As cepas foram caracterizadas por ERIC-PCR e cada uma das 30 amostras analisadas apresentou um perfil genético único, cujas bandas eram diferentes em cada perfil, mostrando polimorfismo entre os modelos estudados.

No presente estudo foi verificada a presença de determinados fragmentos em muitos perfis, diferenciando-se dos estudos realizados por NIKAM (2004) e LING et al. (2000). Porém não foi verificada a presença constante de um fragmento em todos os perfis obtidos como em estudo realizado por GIAMMANCO et al. (2002), quando foram observaram três principais fragmentos e dois menores de peso molecular entre 200 e 1300bp em todos os perfis de *E. coli* O157:H7 obtidos pelos autores, independentemente da origem das cepas. Ao observar a presença constante de um fragmento em todos os perfis obtidos, a técnica de PFGE se tornou desapropriada para distinguir epidemiologicamente cepas de *E. coli* O157:H7 não relacionadas entre si.

GIAMMANCO et al. (2002) estudaram 57 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de casos de pessoas com síndrome urêmica-hemolítica e diarreia, de “swabs” coletados do reto de bovinos. A relação genética entre estas cepas foi estudada através da técnica de PFGE. Foram obtidos 54 perfis que apresentavam de 13 a 22 bandas, que se agruparam em quatro “clusters”, apresentando alto poder de discriminação. Esta técnica também possibilitou a demonstração da transmissão horizontal de uma única cepa de *E. coli* O157:H7 isolada de duas fazendas, assim como a caracterização de isolados relacionados a surtos alimentares.

JOHNSON et al. (1995) utilizaram a técnica de PFGE para investigação de um surto de *E. coli* O157:H7 veiculado por carne bovina, e as cepas isoladas de pacientes resultaram no mesmo perfil das cepas isoladas da carne analisada, dividido em 20 fragmentos, comprovando a relação genética entre as cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de pacientes e dos alimentos implicados no surto.

Neste estudo não foi verificada a transmissão horizontal de uma única cepa de *E. coli* O157:H7, uma vez que os oito perfis obtidos de *E. coli* O157:H7 foram distribuídos entre cepas encontradas apenas nas meias-carcaças de onde foram isoladas.

Analisando os perfis de ERIC-PCR em *E. coli* aviária, MOURA et al. (2001) obtiveram perfis que variavam de oito a 17 fragmentos, e pela técnica de REP-PCR, perfis com seis a 20 fragmentos. As amostras foram agrupadas em quatro “clusters” principais, cada um com 60% de similaridade tanto por ERIC-PCR quanto por REP-PCR, correspondendo a cepas com diferentes graus de patogenicidade. Entretanto, 28/50 (56%) das cepas patogênicas foram agrupadas em dois grupos externos a três “clusters” principais e 86% das cepas não-patogênicas foram agrupadas em um “cluster” e um subgrupo. Os 32 sorotipos detectados foram distribuídos em todos os “clusters” com diferentes perfis genéticos, entretanto cepas do mesmo sorotipo tenderam a formar “clusters” com similaridade maior que 80%.

No presente trabalho os 40 perfis de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 observados distribuíram-se entre os agrupamentos formados, estando, a maioria, no “cluster” A. O único sorotipo conhecido é *E. coli* O157:H7, distribuído em oito perfis, dos quais sete se agruparam no “cluster” A.

A grande diversidade genética observada em *E. coli* isoladas da superfície de uma mesma meia-carcaça ou de mesma amostra sugere que a contaminação das mesmas tenha origem em múltiplas fontes ou mesmo que haja coexistência de diferentes sorovares em uma mesma amostra, já que se desconhecem ainda os sorovares das amostras em estudo, com exceção do sorovar O157:H7. A grande diversidade genética poderia ainda ser explicada devido às muitas fontes de contaminação dentro do matadouro-frigorífico, como pela pele do animal, manipuladores, utensílios e equipamentos contaminados, contaminação cruzada por uma meia-carcaça.

7. CONCLUSÕES

- No matadouro-frigorífico A foi encontrada uma maior variedade de perfis tanto de *E. coli* quanto de *E. coli* O157:H7 do que no matadouro-frigorífico B.
- Elevada heterogeneidade genética foi observada tanto em *E. coli* quanto em *E. coli* O157:H7, embora a maioria analisada tenha se agrupado em um “cluster” principal.
- Os perfis de *E. coli* O157:H7 mostraram-se exclusivos a este sorovar e também foram específicos de cada fonte.
- Foi verificada a ocorrência de cepas não-tipáveis de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas dos dois matadouros-frigoríficos, em número elevado neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, D. Manuseamento de produtos hortifrutícolas. **SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação**. Portugal, 2005.
2. AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Biology: Molecular Biology**. New York, John Wiley & Sons, v.1, 459p, 1994.
3. ANANG, D.M.; RUSUL, G.; JAMILAH, B.; FOO, H.L. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in chicken breast stored at 4°C. **Food Control**, v.18, p. 961-969, 2007.
4. ARAUJO, V. S.; PAGLIAREA, V. A.; QUEIROZ, M. L.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheeses commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1172-1177, 2002.
5. AROCHA, M.M.; McVEY, M.; LODER, S.D.; RUPNOW, J.H.; BULLERMAN, L.B. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O167:H7 during the manufacturing of cottage cheese. **Journal Food Protection**, v.55, p.379-381, 1992.
6. BARDHAN, P. K., ALBERT, M.J.; ALAM, N.H.; FARUQUE, S.M.; NEOGI, P.K.B; MAHALANABIS, D. Small bowel and fecal microbiology in children suffering from persistent diarrhea in Bangladesh. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.26, p.9-15, 1998.
7. BARHAM, A.R.; BARHAM, B.L.; JOHNSON, A.K.; ALLEN, D.M.; BLANTON, J.R.; MILLER, M.F. Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **Journal Food Protection**, v.65, p.280-283, 2002.
8. BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ATHUR, T.M.; RIVERA-BETANCOURT, M. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. **Journal Food Protection**, v.66, p.1978-1983, 2003.
9. BEATTY, M.E.; BOPP, C.A.; WELLS, J.G.; GREENE, K.D.; PUHR, N.D.; MINTZ, E.D. Enterotoxin producing *Escherichia coli* O169:H41, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.3, p.518-523, 2004.
10. **BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY**. 9. ed. Baltimore: Williams, & Wilkins, 1994.

11. BERNARDI, E.; ARMAS, R.D.; RIBEIRO, G.A. Caracterização microbiológica e sorológica de linhagens de *Escherichia coli*, isolada de carne moída comercializada em Pelotas, RS. **Higiene Alimentar**, v.18, p.182-186, 2004.
12. BERSOT, L.S. Etapas críticas e medidas preventivas para contaminação microbiana no abate de bovinos. 3p, 2001. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras%20-%20resumos/resumo%20Luciano%20Bersot.doc>. Acesso em janeiro de 2008.
13. BESSER, T. E., RICHARDS, B. L.; RICE, D. H.; HANCOCK, D. D. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. **Epidemiology and Infections**, v.127, n.3, p.555-560, 2001.
14. BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; ALONSO, M.P.; COIRA, A.; RODRÍGUEZ, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; USERA, M.A. Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and Non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p.345-351, 2003.
15. BONACORSI, S.; BINGEN, E. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p.373-381, 2005.
16. BONACORSI, S.; CLERMONT, O.; HOUDOUIN, V.; CORDEVANT, C.; BRAHIMI, N.; MARECAT, A.; TINSLEY, C.; NASSIF, X.; LANGE, M.; BINGEN, E. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. **Journal of Infection Diseases**, v.183, p.1895-1906, 2003.
17. BROCCHI, M.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; STEHLING, E.G.; CAMPOS, T.A.; NAKAZATO, G.; CASTRO, A.F.P.; SILVEIRA, W.D. Typing of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by REP-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p.69-73, 2006.
18. BURR, M.D.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.24-30, 1998.
19. CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R.C.; GENOVESE, K.J.; POOLE, T.L.; ANDERSON, T.J.; BYRD, J.A.; KUBENA, L.F.; NISBET, D.J. Sodium chlorate supplementation reduces *E. coli* O157:H7 populations in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.1683-1689, 2002.

20. CALLAWAY, T.R.; ANDERSON, R.C.; EDRINGTON, T.S.; GENOVESE, .J.; BISCHOFF, K.M.; POOLE, T.L.; JUNG, Y.S.; HARVEY, R.B.; NISBET, D.J. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? **Journal of Animal Science**, v.82, p.92-99, 2004.
21. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak at a Summer Camp - Virginia, 1994. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00037189.htm>. Acesso em junho de 2008.
22. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with eating alfafa sprouts – Michigan and Virginia, June – July 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.46, n.32, p.741-744,1997.
23. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation - Okinawa, Japan, February 2004. **Weekly**, p.40-42. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5402a3.htm>. Acesso em junho de 2008.
24. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Raw Milk Consumption in the Pacific Northwest – USA, 2005. **Foodborne Pathogens and Disease**, p.321-328. Disponível em <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2007.0072>. Acesso em junho de 2008.
25. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multi-State Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections From Spinach, September – October, 2006. Disponível em <http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/>. Acesso em junho de 2008.
26. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections Linked to Topp's Brand Ground Beef Patties – October, 2007. Disponível em <http://www.cdc.gov/ecoli/2007/october/100207.html>. Acesso em junho de 2008.
27. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections – July, 2008. Disponível em <http://www.cdc.gov/ecoli/june2008outbreak/>. Acesso em julho de 2008.
28. CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of Shiga-like-toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated

from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal Food Protection**, v.60, p.177-180, 1997.

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

30. CFIA – Canadian Food Inspection Agency. [Canada Says Beef Is Contaminated With *E. coli* O157:H7](http://www.ecoliblog.com/2008/05/articles/e-coli-recalls/canada-says-beef-is-contaminated-with-e-coli-o157h7/). 2008. Disponível em: <http://www.ecoliblog.com/2008/05/articles/e-coli-recalls/canada-says-beef-is-contaminated-with-e-coli-o157h7/>. Acesso em julho de 2008.

31. CHANSIRIPORNCHAI, N.; RAMASOOTA, P.; SASIPREYAJAN, J.; SVENSON, S.B. Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.1, p.75-80, 2001.

32. CLARKE, S. T. Diarrheogenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, 2001.

33. CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.; WILLIAMS, P.H. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects. **British Journal of Biomedical Science**, v. 59, 9p, 2002.

34. COSTA, F.N.; ALVES, L.M.C.; MONTE, S.S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina moída, comercializada na cidade de São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, v. 11, p.49-52, 2000.

35. COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; SPRICIGO, D.A.; WITT, N.M.; MARCHIORO, S.B.; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

36. DEVASIA, R.A.; JONES, T.F.; WARD, J.; STAFFORD, L.; HARDIN, H.; BOPP, C.; BEATTY, M.; MINTZ, E.; SCHAFFNER, W. Endemically Acquired Foodborne Outbreak of Enterotoxinproducing *Escherichia coli* Serotype O169:H41. **The American Journal of Medicine**, v.119, p.168, 2006.

37. DIETZMAN, D.E.; FISCHER, G.W.; SCHOENKNECHT, F.D. Neonatal *Escherichia coli* septicemia—bacterial counts in blood. **Journal of Pediatrics**, v.85, p.128-130, 1974.

38. DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWISKY, M. J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p.2572-2577, 2000.
39. DTA – Manual das doenças transmitidas por alimentos e água. *Escherichia coli* O157:H7 – Enterohemorrágica (EHEC). 2000. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>. Acesso em junho de 2008.
40. DUCHAUD, E.; RUSNIOK, C.; FRANGEUL, L. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **National Biotechnology**, v. 21, n.11, p.1307-1311, 2003.
41. DURSO, L.M.; REYNOLDS, K.; BAUER, N.; KEEN, J.E. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 infections among livestock exhibitors and visitors at a Texas County Fair. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.5, n.2, p.193-201, 2005.
42. ESPARIS, C.M.; TEIXEIRA, L.M.; KINUE, I.; GIL, P.F.; ALMEIDA, M.M.T.B.; LOPES, G.S.; BRAVO, V.L.; PACHECO, R.S.; REGUA-MANGIA, A.H. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.6, p.573-576, 2006.
43. FARAH, S.M.S.S. Características fenotípicas e genotípicas de estirpes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Paraná. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
44. FDA – Food and Drug Administration. FDA Finalizes Report on 2006 Spinach Outbreak, March, 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01593.html>. Acesso em junho de 2008.
45. FENG, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel vehicles of infections and emergence of phenotypic variants. **Emerging Infectious Diseases**, v.1, n.2, 1995.
46. FERREIRA, M.G.A.B.; SOBRINHO, A.J.C. Avaliação da qualidade bacteriológica das carnes bovina moída e suína (pernil) “in natura” e/ou refrigerada, em supermercados, frigoríficos e feiras livres do município de São Luís, MA. **Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p.87-93, 2003.

47. FRANÇA FILHO, A.T. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do Estado de Goiás habilitados para exportação. 2005. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2005.
48. FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p, 2003.
49. FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p.359-363, 2005.
50. GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos. Qualidade das matérias primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2008.
51. GIAMMANCO, G.M.; PIGNATO, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; GIAMMANCO, G. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Isolated in Italy and in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4619-4624, 2002.
52. GONÇALVES, E.S.; MARQUES, M.H.M.; LUCCA, P.S.R. A segurança alimentar e os consumidores: um breve estudo sobre a *Escherichia coli*. **Revista CESUMAR – Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v.7, 2002.
53. GORDILLO, M.E.; REEVE, G.R.; PAPPAS, J.; MATHEWSON, J.J.; DUPONT, H.L.; MURRAY, B.E. Molecular characterization of strains of Enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.4, 1992.
54. GUAN, S.; XU, R.; CHEN, S.; ODUMERU, J.; GYLES, C. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animals and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.2690-2698, 2002.
55. GUN, H.; YILMAZ, A.; TURKER, S.; TANLASI, A.; YILMAZ, H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, 2002.

56. HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. Molecular evolutionary relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Japan Journal of Infetion Diseases**, v.60, p.5080-5088, 2007.

57. HEINIKAINEN, S.; POHJANVIRTA, T.; EKLUND, M.; SIITONEN, A.; PELKONEN, S. Tracing Shigatoxigenic *Escherichia coli* O103, O145 and O174 infections from farm residents to cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.10, p.3817-3820, 2007.

58. HUI, Y.H.; GORHAM, J.R.; MURRELL, K.D.; CLIVER, D.O. **Foodborne disease handbook**, v.1, 10p, New York: Marcel Dekker, 1994.

59. HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elementes in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.

60. HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, n.11, p.2465-2466, 1998.

61. HUSSEIN, H. S., SAKUMA, T. Invited review: prevalence of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v.88, 2005.

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

63. 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.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.; GUTH, B.E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Disease Journal**, v. 8, 3p, 2002.

64. JALALUDDIN, S.; DE MOL, P.; HEMELHOF, W.; BAUMA, N.; BRASSEUR, D.; HENNART, P.; LOMOYO, R.E.; ROWE, B.; BUTZLER, J-P. Isolation and characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* EaggEc by genotypic and phenotypic markers, isolated from diarrheal children in Congo. **Clinical Microbiology and Infection**, v.4, p.213-219, 1998.

65. JAY, J.M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**, 6.ed. Rio de Janeiro: Artmed, 369p, 2005.
66. JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; O'BRYAN, T. T. *Escherichia coli* O18:K1:H7 isolates from patients with acute cystitis and neonatal meningitis exhibit common phylogenetic origins and virulence factor profiles. **Journal of Infection Diseases**, v. 183, p.425-434, 2001.
67. JOHNSON, J.R.; CLABOTS, C. Improved Repetitive-Element PCR Fingerprinting of *Salmonella enterica* with the Use of Extremely Elevated Annealing Temperatures. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n.2, p.258-264, 2000.
68. JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A.L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **Journal of Infection Diseases**, v.183, p.78-88, 2001.
69. JOHNSON, J.M.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K.C.; BRYANT, J.L. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Study of *Escherichia coli* O157:H7 during a Food-Bourne Outbreak. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, 1995.
70. JOHNSON, J.R.; O'BRYAN, T.T. Improved Repetitive-Element PCR Fingerprinting for Resolving Pathogenic and Nonpathogenic Phylogenetic Groups within *Escherichia coli*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p.265-273, 2000.
71. KANG, G.; BALASUBRAMANIAN, K.A.; KOSHI, R.; MATHAN, M.M.; MATHAN, V.I. Salicylate inhibits fimbriae mediated HEp-2 cell adherence of and haemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology letters**, p.257-265, 1998.
72. KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 2, p.123-140, 2004.
73. KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.6, p.2043-2049, 2001.
74. KASNOWSKI, M.C. *Listeria ssp.*, *Escherichia coli*: Isolamento, Identificação, Estudo Sorológico e Antimicrobiano em Corte de Carne Bovina

(Alcatra) Inteira e Moída. Dissertação apresentada à Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2004.

75. KASSENBERG, H.D.; HEDBERG, C.W.; HOEKSTRA, M.; EVANS, M.C.; CHIN, A.E.; MARCUS, R.; VUGIA, D.J. SMITH, K.; AHUJA, S.D.; SLUTSKER, L. GRIFFIN, P.M. Farms visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. **Clinical Infection Diseases**, v.38, 2004.

76. KIJMA-TANAKA, M. A nacional surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food-producing animals in Japan. **National Veterinary Assay Laboratory**, v.52, p.230-237, 2005.

77. KIM, K. S. *Escherichia coli* translocation at the blood–brain barrier. **Infection Immunology**, v. 69, p.5217-5222, 2001.

78. KUMAR, S. et al. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. **Molecular Biology Evolution**, v. 13, p.584–593, 1996.

79. LAN, R.; ALLES, M.C.; DONOHOE, K.; MARTINEZ, M.B.; REEVES, P.R. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p.5080-5088, 2004.

80. LING, O.; RASUL, G.; ISMAIL ABDUL KARIM, M.; PURWATI, E.; LIHAN, S. Enterobacterial repetitive intragenic consensus (ERIC) genotyping of *Escherichia coli* O157:H7. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.3, 2000.

81. LOPES, J.H. Ocorrência de coliformes, coliformes termololerantes, *Escherichia coli* e *E. coli* O157:H7 em meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas em matadouros-frigoríficos de Goiás, sob inspeção federal. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.

82. MacDONALD, D.M.; FYFE, M.; PACCAGNELLA, A.; TRINIDAD, A.; LOUIE, K.; PATRICK, D. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami: British Columbia, Canada, 1999. **Epidemiology and Infection**, v.132, p.283-289, 2004.

83. MANGIA, R. A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Infection**, v. 48, p.161-167, 2004.

84. MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHEL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p.3479-3483, 1992.
85. MARTINS, M.F.; ROSSI-MARTINEZ, N.M.; FERREIRA, A.; BROCHI, M.; YANO, T.; CASTRO, A.F.P.; SILVEIRA, W.D. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p.51-59, 2000.
86. MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods of the Microbiological Examinations of Foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001.
87. MILLEMAN, Y.; LESAGE-DESCAUSES, M.C.; LAFONT, J.P.; CHASLUS-DANCLA, E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.14, 1996.
88. MINCIS, M.; MINCIS, R.; CALICHMAN, S. **Diarréias agudas: atualização diagnóstica e terapêutica**. Prática hospitalar, ano X, n.55, 2008.
89. MITSUDA, T.; MUTO, T.; YAMADA, M.; KOBAYASHI, N.; TOBA, M.; AIHARA, Y.; ITO, A.; YOKOTA, S. Epidemiological Study of a Food-Borne Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.3, p.652-653, 1998.
90. [MOBLEY, R.](#); MADDEN, U.; BROOKS-WALTER, A. **Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in fecal samples in meat goats**. Canadá, 2004. Disponível em: http://findarticles.com/p/articles/mi_qa3673/is_200404/ai_n9345200/pg_3?tag=artBody;col1. Acesso em 12 de julho de 2008.
91. MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p.245-252, 2008.
92. MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; NORDIN, R.; MAZUMDER, A. Evaluation of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic- and wild-animals. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.733-740, 2007.

93. MOTTA, M.R.A.; BELMONTE, M.A.; PANETTA, J.C. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.14, p.59-62, 2000.
94. MOURA, A.C.; IRINO, K.; VIDOTTO, M.C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus and Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v.45, n.1, 2001.
95. NAJAND, L.M.; GHANBARPOUR, R. A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. **Veterinarski Arhiv** 76, v. 6, Iran, 2006.
96. NAKASONE, N.; TRAN, H.H.; NGUYEN, M.B.; HIGA, N.; TOMA, C.; SONG, T.A.; ICHINOSE, Y.; IWANAGA, M. Short report: isolation of *Escherichia* O157:H7 from fecal samples of cows in Vietnam. **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v.73, p.586-587, 2005.
97. NARDI, A.R.M.; SALVADORI, M.R.; COSWIG, L.T.; GATTI, M.S.V.; LEITE, D.S.; VALADARES, G.F.; NETO, M.G.; SHOCKEN ITURRINO, R.P.; BLANCO, J.E.; YANO, T. Type 2 heat-labile enterotoxin (LT-II) producing *Escherichia coli* isolated from ostriches with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.105, 2005.
98. NASTASIJEVIC, I.; MITROVIC, R.; BUNCIC, S. Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, 2008.
99. NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.88, n. 1, 1998.
100. NAYLOR, S. W.; LOW, J. C.; BESSER, T. E.; MAHAJAN, A.; GUNN, G. J.; PEARCE, M. C.; MCKENDRICK, I. J.; SMITH, D. G. E.; GALLY, D. L. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. **Infection and Immunity**, v.71, p.1505-1512, 2003.
101. NGUYEN, T.V.; LE VAN, P.; LE HUY, C.; NGUYEN GIA, K.; WEINTRAUB, A. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. **International Journal of Infection Diseases**, v.10, p.298-308, 2006.

102. NIKAM, A.K. Genomic Fingerprinting of *Escherichia coli* Strains Using Repetitive Sequence Based Polymerase Chain Reaction. Tese apresentada à Gujarat Agricultural University, Anand, 2004.

103. NOWAK, B. Trends in the production and storage of fresh meat – the holistic approach to bacteriological meat quality. **International Journal of Food Science**, v.41, 2006.

104. NUNES, I. A. *Salmonella* Enteritidis – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao RNA. Tese de doutorado apresentada à Universidade de São Paulo - USP, 1999.

105. OLIVA, C.A.G.; SCALETSKY, I.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.4. São Paulo, 1997.

106. OLIVEIRA, N.M.S.; NASCIMENTO, L.C.; FIORINI, J.E. Isolamento e Identificação de Bactérias Facultativas Mesófilas em Carnes Frescas Bovinas e Suínas. **Higiene Alimentar**, v.16, n.91, p.49-55, 2002.

107. OLIVINDO, C.S. Detecção de microrganismos utilizando a técnica de PCR em seqüências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

108. OSEK, J. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans, cattle and pigs. **Veterinary Medicine**, v.49, p.317-326, Czech, 2002.

109. PAO, S.; PATEL, D.; KALANTARI, A.; TRITSCHLER, J.P.; WILDEUS, S.; SAYRE, B.L. Detection of Salmonella Strains and *Escherichia coli* O157:H7 in Feces of Small Ruminants and Their Isolation With Various Media. **Applied Environ Microbiology**, v. 71, p.2158-2161, 2005.

110. PEI, Y.; TERAJIMA, J.; SAITO, Y.; SUZUKI, R.; TAKAI, N.; IZIMIYA, H.; MORITA-ISHIHARA, T.; OHNISHI, M.; MIURA, M.; IYODA, S.; MITOBE, J.; WANG, B.; WATANABE, H. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. **Japan Journal of Infection Diseases**, v. 61, p.58-64, 2007.

111. PIGATTO, C. P.; BARROS, A. R. Qualidade da carne moída bovina resfriada, comercializada em açougues da região de Curitiba. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n. 108, p.53- 57, 2003.

112. PRUIMBOOM-BREES, I.M.; MORGAN, T.W.; ACKERMANN, M.R.; SAMUEL, J.E.; CORNICK, N.A.; MOON, H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **PNSA - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p.10325-10329, 2000.

113. QUINN, M.E.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolf Publishing: London, 1994.

114. RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprint and computer-assisted pattern analysis. 2003. Disponível em:< <http://www.msu.edu/asci/debrujin/dna.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2007.

115. RAGHUBEER, E.V.; KE, J.S.; CAMPBELL, M.L.; MEYER, R.S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. **Journal Food Protection**, v.58, p.13-18, 1995.

116. RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.3615-3626, 2005.

117. REIS, V.W. Fatores de risco da diarreia humana associado às condições de saneamento básico em Ouro Preto, MG. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental com ênfase no Uso e Conservação de Recursos Hídricos da Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2007.

118. RENTER, D.G.; SMITH, D.R.; KING, R.; STILBORN, R.; BERG, J.; BEREZOWSKI, J.; McFALL, M. **Detection and determinants of *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta feedlot pens immediately prior to slaughter**. The Canadian Journal of Veterinary Research, v.72. USA, 2008.

119. RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, p.681-685, 1983.

120. RIOS, E.R. Detecção de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 em superfície de meias-carcaças de bovinos abatidos em estabelecimentos sob inspeção federal

em Goiânia-GO. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2005.

121. RITTER, R.; SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Contaminação bacteriana da carne moída bovina comercializada em bancas do mercado público de Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v.15, n.85, p.50-56, 2001.

122. ROBINS-BROWNE, R.; ELLIOT, M.E.; DESMARCHELIER, P. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia**. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998.

123. ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. Contribution of *Escherichia coli* to diseases of the gastrointestinal tract. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.17, p.467-475, 2002.

124. ROLDÁN, M.L.; CHINEN, I.; OTERO, J.L.; MILIWEBSKY, E.S.; ALFARO, N.; BURNS, P.; RIVAS, M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 39, p.113-119, 2007.

125. ROWLANDS, R.E.G; RISTORI, C.A.; FERREIRA, T.; YTO, A.Y.; FRANCO, D.L.; SCOLA, M.C.G.; JAKABI, M.; GELLI, D.S.; TAMPLIN, M.; CUNHA, T.N.; GASPARI, E.N. Produção e aplicação de novos anticorpos monoclonais na padronização de técnicas imunológicas para a detecção das bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1 e toxinas Stx1, Stx2 em alimentos. **Bepa – Boletim Epidemiológico Paulista**, v.4, n.37, 2007.

126. RUSSELL, J.B; DIEZ-GONZALEZ, F.; JARVIS, G.N. Invited review: effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. **Journal Dairy Science**, v.83, p.863-873, 2000.

127. SAINZ, T.; PEREZ, J.; VILLASECA, J.; HERNANDEZ, U.; ESLAVA, C.; MENDOZA, G.; WACHER, C. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.3, p.357-367, México, 2005.

128. SCALETSKY, I.C.A.; FABBRICOTTI, S.H.; CARVALHO, R.L.B.; NUNES, C.R.; MARANHÃO, H.S.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.2, p.645-648, 2002.

129. SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.; MEDOFF, G. **Microbiologia – Mecanismos das doenças infecciosas**. 3.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

130. SHINAGAWA, K. Correspondance and problem for enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka City, Iwate. **Koshu Eisei Kenkyu**, v.46. 1997.

131. SHUTERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, 1995.

132. SILVA, J.A.; SILVA, W.D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de patologia tropical**, v. 34, 2005.

133. SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n 2, p.167-173, 2003.

134. SILVA, Z.N.; CUNHA, A.S.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.A.M.; ALMEIDA, A.C.F.; QUEIROZ, M.L.P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p.375-379, São Paulo, 2001.

135. SILVEIRA, N.F.; SILVA, N.; CONTRERAS, C. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.223-227,1999.

136. SILVEIRA, W.D.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; BARBOSA, I.A.G.C.D.; LEITE, D.S.; CASTRO, A.F.P.; BROCCHI, M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p.323-328, 2002.

137. SMITH, H.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T. *E. coli* as a cause of outbreaks of diarrhoeal disease in the UK. **Microbiology Today**, v.3, Inglaterra, 2004.

138. SONNTAG, A.K.; PRAGER, R.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; KARCH, H. Phenotypic and Genotypic Analyses of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 Strains from Patients in Germany. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.954-962, 2004.

139. SOUSA, S.P. The versatile strategies of *Escherichia coli* somatotypes: A mini review. **Journal of Venomous Animal and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, 2006.

140. SPANO, L.C.; SADOVSKY, A.D.I.; SEGUI, P.N.; SAICK, K.W.; KITAGAWA, S.M.S.; PEREIRA, F.E.L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I.C.A. Age specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.359-363, 2008.

141. STANFORD, K.; BACH, S.J.; MARX, T.H. Monitoring *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated and naturally colonized feedlot cattle and their environment. **Journal Food Protection**, v.68, p.26-33, 2005.

142. STELLA, A.E.; RIGOBELLO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.; MALUTA, R.P.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, 2008.

143. STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B.D. **Microbiologia Ilustrada**. São Paulo: Artmed S.A, 2004.

144. STRUELENS, M. J. et al. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical microbiology and infection**. v. 2, p.2-11, 1996.

145. STRUELENS, M. J. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, n. 5, p.581-585, 1998.

146. TERAJIMA, J.; IZUMIYA, H.; IYODA, S. High genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. **Journal of Japan Association of Infection Diseases**, v. 55, p.19-22, 2002.

147. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

148. TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Disease**, v. 8. 2002.

149. TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VAN HOOFF, J.; DE ZUTTER, L. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1564-1569, 2003.
150. VAN LITH, L.A.J.T.; AARTS, H.J.M. Polymerase chain reaction identification of Salmonella serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, 1994.
151. VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes**. Nucleic Acids Research. v. 19, p. 6823-6831, 1991.
152. VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. **Methods of Cellular and Molecular Biology**, v. 5, p.25-40, 1994.
153. VICENTE, A.C.P.; TEIXEIRA, L.F.M. ; ROJAS, L.I.; LUNA, M.G. ; SILVA, L.; ANDRADE, J.R.C.; GUTH, B.C.C. Outbreaks of cholera-like diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in the Brazilian Rainforest. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p.669-674, 2005.
154. VIEIRA, N.; BATES, S.J. ; SOLBERG, O.D. ; PONCE, K.; HOWSMON, R.; CEVALLOS, W.; TRUEBA, G.; RILEY, L.; EISENBERG, J.N.S. High prevalence of Enteroinvasive *Escherichia coli* Isolated in a Remote Region of Northern Coastal Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.73, p.528-533, 2007.
155. VILA, J.; VARGAS, M.; RUIZ, J.; ESPASA, M.; PUJOL, M.; CORACHÁN, M.; ANTA, M.T.J.; GASCÓN, J. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, p.996-1000, 2001.
156. WANG, Z.; LUO, T.; ROEDER, R.G. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.7,1997.
157. WATANABE, H.; TERAJIMA, J.; IZUMIYA, H. Pulsenet Japan: surveillance system for the early detection of diffuse outbreak based on the molecular epidemiological method. **Journal of Japan Association of Infection Diseases**, v. 76, p.842-848, 2002.
158. WATANABE, H.; WADA, A.; INAGAKI, Y. 1996: Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, p.831-832, Lancet, 1996.

159. WATANABE, Y.; OZASA, K.; MERMIN, J.H.; GRIFFIN, P.M.; MASUDA, K.; IMASHUKU, S.; SAWADA, T. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Japan. **Emerging Infectious Diseases**, p.424-428, 1999.

160. ZHANG W., BERBEROV E., FREELING J., HE D., MOXLEY R.; FRANCIS D.H. Significance of heat stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity study. **Infection Immunology**, v. 76, p.3107-3114, 2006.

161. ZHAO, T., M. P. DOYLE, AND R. E. BESSER. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. **Applied Environment Microbiology**, v.59, p.2526-2530, 1993.