

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
QUE APRESENTAM O GENE DE SHIGA TOXINA EM
QUEIJO MUSSARELA PRODUZIDO ARTESANALMENTE**

Patrícia Alves Cardoso

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
MAIO de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
QUE APRESENTAM O GENE DE SHIGA TOXINA EM
QUEIJO MUSSARELA PRODUZIDO ARTESANALMENTE**

Patrícia Alves Cardoso

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, “Campus” de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Microbiologia
Agropecuária.

Área de concentração em Microbiologia
Agropecuária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Maio de 2009

Cardoso, Patrícia Alves
C268o Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de Shiga toxina em queijo mussarela produzido artesanalmente / Patrícia Alves Cardoso. -- Jaboticabal, 2009
xiii, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: José Moacir Marin
Banca examinadora: Everlon Cid Rigobelo, Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin
Bibliografia

1. *Escherichia coli*. 2. queijo. 3. ocorrência I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:673.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRICIA ALVES CARDOSO – nascida em Almenara, MG, no dia 05/01/1965, graduada no Centro Universitário Barão de Mauá em 2002 em Biologia (Licenciatura Plena); professora no ensino fundamental e médio desde 1991.

Nosso Senhor Jesus Cristo

O bom pastor

O senhor é meu pastor, nada me falta.
Em verdes pastagens me faz repousar.

Para as águas tranquilas me conduz
e restaura minhas forças;
ele me guia por caminhos justos, por
causa do seu nome.

Ainda que eu caminhe por um vale tenebroso,
Nenhum mal temerei, pois estás junto a mim;
teu bastão e teu cajado me deixam tranqüilo.

Diante de mim preparas uma mesa,
à frente dos meus opressores;
unges minha cabeça com óleo,
e minha taça transborda.

Sim, felicidade e amor me seguirão
todos os dias da minha vida;
minha morada é a casa do senhor
por dias sem fim.

(Salmo 23)

Senhor Jesus Cristo guarda- me, pois me abrigo em ti.

DEDICATÓRIA

A minha família

Gostaria de agradecer ao meu pai, Gilberto Cardoso de Almeida a minha mãe Berenice Alves Martins, que com muito orgulho os tenho como exemplo de vida. Pelo apoio e compreensão nas ausências familiares durante os vários anos consagrados a realização deste projeto, bem como pela força e alegria de viver que têm imprimido à minha vida.

Aos meus queridos irmãos Adriana Alves de Almeida, Flávio Alves de Almeida e Malena Alves Cardoso pelo constante incentivo, pelo companheirismo, pelo amor e pela generosa amizade.

A minha querida avó Cirila Martins, pelos gestos de carinho, amor e pelas orações que me deram muita força.

A minha querida avó Helena Carvalho de Almeida (*in memorian*) pelo exemplo de fé e coragem.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. José Moacir Marin

“O conhecimento é um norte que nos ajuda a encontrar e a percorrer a estrada da vida. É um caminho para se chegar à sabedoria”. Ele é amigo permanente, é humilde, pois quanto mais se conhece, mais se percebe o quanto falta para se alcançar o cume. É simples, sedutor, livre e divino.

O conhecimento nos aproximou, professor.

Minha sabedoria só se fez sabedoria ao encontrar a sua.

Obrigada, professor Marin, por suas orientações e por ter me feito compreender que nascemos para a evolução e que, a cada dia, uma nova lição pode ser aprendida.

Gostaria de agradecer:

- ✓ À UNESP pelo curso de Pós-Graduação.
- ✓ Aos amigos do laboratório Patrícia Rangel, Edilene, Everlon, Vanessa, Daniela e Cleber pelo convívio harmonioso, amizade e conhecimentos transmitidos.
- ✓ À Tânia Marques da Silva, técnica do laboratório de Genética do departamento de Morfologia, Fisiologia e Estomatologia da USP, pela amizade, carinho e contribuição na realização deste trabalho.
- ✓ À Marly Wanderley pela amizade e apoio espiritual.
- ✓ Aos amigos Dirce De Bortoli, Eleusa e Dirceu, pela preciosa ajuda em vários momentos... vocês foram anjos da guarda que Jesus colocou no meu caminho.
- ✓ Aos Docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária, pelos ensinamentos.
- ✓ Ao pessoal da seção de Pós-Graduação, pelos esclarecimentos fornecidos.
- ✓ À todos as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para confecção deste trabalho.

Deus lhes pague

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	14
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
II.1 Queijo mussarela.....	18
II.2 <i>Escherichia coli</i>	19
II.2.1 Classificações de <i>E. coli</i>	20
II.2.2 <i>Escherichia coli</i> comensal.....	26
II.2.3 <i>E.coli</i> extraintestinal (ExPEC).....	26
II.3 Antimicrobianos e suas resistências.....	27
II.3.1 Grupos de antimicrobianos.....	30
II.3.1.1. Betalactâmicos	30
II.3.1.2. Aminoglicosídeos.....	31
II.3.1.3. Tetraciclinas.....	32
II.3.1.4. Quinolonas.....	32
II.3.1.5. Sulfonamidas.....	33
II.3.2 Origem da resistência.....	34
III. OBJETIVOS.....	35
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
IV.1 Amostras de queijo.....	36
IV.2 Isolamento e identificação de <i>E.coli</i>	37
IV.3 Conservação das cepas de <i>E. coli</i>	38
IV.4 Extração de DNA Template.....	39
IV.5 Amplificação através da técnica de PCR.....	39
IV.6 O157 Latex Aglutinação.....	42
IV.7 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana.....	43
IV.8 Meios de cultura utilizados.....	44

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
VI. CONCLUSÕES.....	64
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E – ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)
AAF – plasmídeo que expressa adesina
afa – adesina afimbrial
ATP - Adenosina trifosfato
BHI – Brain Heart Infusion
°C – Graus Celsius
COOH - carboxila
DAEC – *Escherichia coli* que adere difusamente
DNA – Ácido desoxirribonucléico
eae - gene de ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)
EaggEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
EAST – enterotoxina termoestável
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
EspA, EspB, EspD - proteínas
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC – *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal
g – gramas
H – antígeno flagelar
HC – colite hemorrágica
K – antígeno capsular
LB – Meio de cultura Luria Bertoni
LEE – local de entumescimento no enterócito (“locus of enterocyte effacement”)
L – litro
Mm – milimol
mL – mililitro
O – antígeno somático
ORFs – frames abertos de leitura
PABA – Ácido para-aminobenzóico
PAI – ilha de patogenicidade
pap – pili associada a pielonefrite
pH – Ponto hidrogeniônico
PCR – reação de polimerase em cadeia (“Polimerase Chain Reation”)
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotação por minuto
sfa – Adesina S Fimbria
STEC – *Escherichia coli* Shigatoxigênica
Stx – shigatoxina
SUH – Síndrome urêmica hemolítica
tir – gene receptor para a intimina

TSI – Tríplice açúcar e ferro
VT – verotoxina
VTEC – Escherichia coli verotoxigênica
 μL – microlitro.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i>	40
Tabela 2 – Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes <i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>afa</i>	42
Tabela 3 – Perfil de virulência em cepas STEC isoladas de queijo mussarela artesanal.....	53
Tabela 4 – Perfil de resistência antimicrobiana em cepas STEC isoladas de queijo mussarela artesanal	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Foto da produção artesanal do queijo mussarela.....	17
Figura 2 – Localização da propriedade onde foram coletadas as amostras do queijo mussarela artesanal.....	36
Figura 3 – Porcentagem de cepas de <i>E. coli</i> isolada de queijo mussarela artesanal, individualizado de acordo com cada coleta.....	49
Figura 4 – Eletroforese em gel TAE 1,5% de PCR para a detecção dos genes <i>stx</i> e <i>eae</i> de <i>Escherichia coli</i>	54
Figura 5 – Eletroforese em gel TAE 1,5% de PCR para a detecção dos genes <i>stx</i> e <i>eae</i> de <i>Escherichia coli</i>	55
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose TAE 1,5% de PCR para detecção dos operons <i>pap</i> , <i>afa</i> e <i>sfa</i> em <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 7 – Susceptibilidade antimicrobiana de 16 cepas STEC isoladas de queijo mussarela artesanal.....	60

OCORRÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* QUE APRESENTAM O GENE DE SHIGA TOXINA EM QUEIJO MUSSARELA PRODUZIDO ARTESANALMENTE.

RESUMO - O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de cepas de *Escherichia coli* produtoras de Shiga toxina (STEC) em queijos mussarela produzidos artesanalmente. Foram analisadas 59 amostras de queijo, produzidas no Vale do Jequitinhonha (Nordeste de Minas Gerais, Brasil). Isolando-se 147 cepas de *E. coli* e através da técnica de PCR, foram investigadas a presença dos genes da Shiga toxina (*stx 1* e *stx 2*) e da intimina (*eae*). Dezesesseis cepas bacterianas (10,8%) apresentaram o gene *stx* (todas portavam o gene *stx 1*) e 13 delas também se mostraram *eae* positivas. Os isolados de *E. coli* foram também examinados para a detecção dos genes codificadores de adesinas (*pap*, *sfa* e *afa*). Não foram identificados nenhum desses genes. Todas as cepas STEC isoladas foram pesquisadas para resistência a 12 agentes antimicrobianos. As resistências predominantes detectadas foram de 37,5% para estreptomicina, 37,5% para a tetraciclina, 31,2% para a ampicilina e 31,2% para a amicacina. A resistência a múltiplas drogas foi encontrada em 5 cepas (31,2%). A presença dos genes codificadores dos fatores de virulência indica que o queijo mussarela produzido artesanalmente pode representar um risco à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: agentes antimicrobianos, ExPEC, gene *eae*, gene *stx*, resistência a múltiplas drogas, STEC.

Occurrence of *Escherichia coli* strains presenting the Shiga toxin gene in mussarela cheese produced by artesanal method.

SUMMARY - The aim of the present study was to investigate the occurrence of *Escherichia coli* strains presenting the Shiga toxin gene (probably STEC strains) in mussarela cheese produced by artesanal method in the Jequitinhonha Valey (Northeast of Minas Gerais State, Brazil). Fifty-nine cheese samples were analyzed and a hundred forty seven strains of *E. coli* were isolated. Using the PCR method the strains were screened for the Shiga toxin (*stx 1* and *stx 2*) and the intimin (*eae*) genes. Sixteen isolates (10,8%) carried the *stx* gene (all of them showed the *stx 1* gene) and thirteen also presented the *eae* gene. Using the same method the strains were screened for the presence of *pap*, *afa*, and *sfa* genes, adhesin genes characteristics of the *E. coli* extraintestinal pathogenic strains (ExPEC). None of them showed these adhesin genes and could not be classified as an ExPEC strains. The susceptibility of the probably STEC strains to twelve antimicrobial drugs were evaluated. The most important resistance was detected to the streptomycin (37,5%), tetracycline (37,5%), ampicillin (31,2%) and amikacin (31,2%). The multidrug resistance was detected in 5 isolates (31,2%). The presence of coding genes for virulence factors in the *E. coli* isolates recovered from mussarela cheese produced by artesanal method could represent a risk for the human health.

KEYWORDS: antimicrobial agents, ExPEC, *eae* gene, *stx* gene, multidrug-resistance, STEC

I. INTRODUÇÃO

A fabricação de queijo representa uma importante indústria em todo o mundo, sendo porém realizada em pequenas indústrias artesanais com técnicas elementares de higiene.

Um importante agente de contaminação dos alimentos é o manipulador. Em condições muito precárias de higiene, os microrganismos do trato gastrointestinal podem contaminar as mãos dos manipuladores e, conseqüentemente, os alimentos por eles preparados. A higienização inadequada de equipamentos e utensílios constitui outro fator relevante de risco, favorecendo a contaminação cruzada, cuja fonte pode ser a matéria prima, o ambiente ou os próprios manipuladores.

De acordo com vários autores os pontos críticos na fabricação dos queijos mussarela e prato são: a água da torneira, a salmoura e a grande manipulação dos produtos. A aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BFP) aliada a treinamentos dos funcionários e melhoria das instalações pode contribuir para melhoria da qualidade do produto.

O queijo mussarela é um produto típico da Itália, produzido e comercializado no mundo inteiro, feito originalmente com leite de búfala. No entanto, em muitos países utilizam-se misturas de leite bovino e leite de búfala. O queijo mussarela classifica-se como de massa filada, o qual é submetido à fermentação e, posteriormente, escaldado em temperaturas de 80-85°C para permitir a filagem. Em estudos experimentais realizados por diferentes autores foi demonstrado que o tratamento térmico em altas temperaturas durante a fabricação do queijo mussarela exerce um controle efetivo das cepas de STEC.

A *Escherichia coli* é encontrada normalmente no trato intestinal de humanos e de outros animais de sangue quente. Embora a maioria das cepas sejam comensais, algumas cepas de *E. coli* adquiriram modificações genéticas (genes de virulência) que resultaram num aumento da patogenicidade para humanos e animais. Desde a ocorrência de um surto de diarreia causada por *E. coli*

enteropatogênica associada com o consumo de queijo fresco em 1973, a presença desses microrganismos no queijo passou a ter um grande significado.

A *E. coli* produtora da shigatoxina (STEC) é uma das mais importantes causas de intoxicações alimentares. Elas são responsáveis por várias doenças gastrointestinais, incluindo as diarréias aquosas e as sanguinolentas. As crianças são particularmente mais propensas a desenvolver complicações com sintomas neurológicos e renais, e também a síndrome hemolítica urêmica (HUS). Muitos casos de colite hemorrágica (HC) e HUS tem sido atribuídas as cepas O157:H7. Entretanto, em alguns países a importância da STEC não-O157 como causa de HUS, HC e outras doenças gastrointestinais tem sido cada vez mais reconhecidas.

A característica comum, considerada o principal fator de virulência de STEC é a produção da shiga toxina 1 (Stx 1), shiga toxina 2 (Stx 2) ou variantes das mesmas ou ainda a combinação delas. As cepas patogênicas de STEC possuem outros fatores de virulência como a intimina (eae), que é uma proteína essencial para promover a íntima ligação da bactéria à superfície das células gastrointestinais e promover a lesão intestinal “attaching-and-effacing”. As cepas de STEC podem contaminar o leite através da contaminação fecal ou diretamente através de mastites. Para o queijo mussarela a temperatura alta durante o processo de filagem demonstrou ser um fator importante para controlar a presença de cepas O157: H7, no entanto alguns autores indicam o controle higiênico-sanitário durante a fabricação dos queijos como um fator que compromete a qualidade do produto.

Durante a última década tem ocorrido um aumento dos alertas correspondentes aos potenciais problemas para saúde humana devido à seleção de genes de resistência antimicrobiana nos animais utilizados para a alimentação. As espécies bacterianas presentes nos animais podem ser transmitidas para humanos através do leite cru ou mal pasteurizado e derivados, portanto é importante analisar não somente os padrões de resistência antimicrobiana a agentes utilizados na medicina veterinária como também a agentes utilizados na medicina humana. No Brasil existe um número limitado de trabalhos que

abordaram a resistência a antimicrobianos em cepas STEC, principalmente aquelas isoladas de queijo.

Os objetivos deste trabalho foram determinar a presença de cepas virulentas de *E. coli* com base na presença dos genes *stx 1*, *stx 2* e *eae* em amostras de queijo mussarela bem como analisar a susceptibilidade das mesmas frente a 12 agentes antimicrobianos.



Figura 1 – Produção artesanal do queijo mussarela obtida no site <http://www.itesp.sp.gov.br/br/info/noticias/ntc096.aspx>

II. REVISÃO DE LITERATURA

II. 1 Queijo mussarela

O queijo mussarela é originário da Itália, sendo inicialmente produzido à partir de leite de búfala. Atualmente este queijo é produzido também com leite de vaca. O leite de búfala apresenta maiores níveis de proteína, gordura, extrato seco e alguns minerais quando comparado com o leite bovino (ANTUNES et al,1988; MACEDO et al, 2001).

De acordo com a portaria nº 364 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997) atribui-se as denominações ou designações queijo mozzarella, queijo muzzarella ou queijo mussarela destinado ao consumo humano. Adiante, neste trabalho, será denominado genericamente queijo mussarela.

O processo de fabricação do queijo mussarela é composto pelas fases de pasteurização do leite, coagulação, corte, mexedura, dessoragem, prensagem, fermentação, filagem, moldagem, resfriamento, salga e embalagem. A fermentação da massa é um estágio crítico na fabricação dos queijos de massa filada, podendo ocorrer entre 4 horas (culturas termofílicas) até 24 horas (culturas mesofílicas). O processo de filagem consiste na imersão da massa em água a 80-85°C, seguida de agitação até que a mesma comece a “fundir-se” e a esticar-se de maneira uniforme, apresentando-se lisa e com um certo brilho; o processo pode ser manual ou mecânico (FURTADO, 1991).

O queijo mussarela apresenta coloração branca ou levemente amarelada, não maturado consumido puro ou fazendo parte de inúmeros pratos quentes como sanduíches e pizzas (VALLE, 1991).

A partir da década de 70, o queijo mussarela popularizou-se no Brasil com o aumento de pizzarias (FURTADO, 1991). Segundo a Associação das Indústrias de Queijos (ABIQ), atualmente o queijo mussarela é o mais fabricado e consumido no Brasil. Este fato tem estimulado a proliferação de estabelecimentos

clandestinos, sendo a comercialização realizada em bares, mercearias, açougues, hotéis e feiras livres. Nestes casos, a embalagem do produto não passa de um saco plástico lacrado com fio de metal, sem qualquer tipo de identificação quanto ao fabricante ou data de validade.

Existem diversos estudos relatando a fabricação artesanal de queijos no Brasil, muitas vezes com a utilização de leite cru, verificando-se altas contagens de microrganismos patogênicos e indicadores da qualidade higiênico-sanitária (GERMANO et al, 1993; ALMEIDA FILHO et al., 2002; DRUBI et al, 2007; PANETO et al, 2007). Porém dados sobre a qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela são escassos. Além dos eventuais problemas relacionados à saúde pública, a produção do queijo com leite cru, impede a padronização do produto e torna difícil a correção de eventuais problemas.

A ingestão de queijos em condições inadequadas para consumo pode trazer graves conseqüências para a saúde da população.

II. 2. *Escherichia coli*

Ao gênero *Escherichia* pertencem as espécies *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hemanni* e *E. vulneris*, mas, a única de maior importância é a *E. coli*, que compreende um grande número de grupos e tipos sorológicos diferentes, com características de virulência distintas, o que a torna versátil em sua patogenicidade.

A bactéria *E. coli* foi isolada pela primeira vez em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich, no cólon do intestino de um homem (o que explica o “*coli*”). Por muito tempo foi denominada de *Bacterium coli* mas, acabou ganhando o nome do seu descobridor (KONEMAN et al., 1997).

E. coli é um coco-bacilo Gram-negativo, pertence à família *Enterobacteriaceae*, não esporulado, a maioria móvel e aeróbio ou anaeróbio facultativo predominante na microbiota intestinal dos seres humanos e animais de

sangue quente (KONEMAN et al., 1997). É um microrganismo que coloniza tipicamente o trato gastrointestinal infantil dentro de poucas horas de vida, e, dali em diante, a *E. coli* e o hospedeiro obtêm benefícios mútuos, como a fabricação de vitaminas K e B. A *E. coli* permanece inofensivamente confinada na luz intestinal do intestino grosso, contudo em um hospedeiro debilitado ou imunossuprimido ou quando barreiras gastrintestinais são violadas, as cepas de *E. coli* mesmo as não patogênicas podem causar infecção. Três síndromes em geral resultam de infecções inerentes às cepas patogênicas de *E. coli*: infecções do trato urinário, septicemia e diarreia (NATARO & KAPER, 1998).

As cepas de *E. coli* são frequentemente identificadas através de reações bioquímicas. Contudo, esse método deve ser usado com cautela, pois apenas 90% dessas cepas são lactose positivas; algumas cepas de *E. coli* diarreicas, incluindo muitas cepas enteroinvasiva, são lactoses negativas. O teste do indol, positivo em 99% das cepas de *E. coli*, é o melhor teste para identificação dos membros da família *Enterobacteriaceae* (TRABULSI et al., 2002).

A sorotipagem ocupa um lugar de destaque no estudo deste microrganismo. KAUFFMAM (1944), citado por NATARO & KAPER (1998) propôs um esquema para a classificação sorológica de *E. coli*, que permanece sendo usado até os dias atuais. De acordo com o esquema de KAUFFMAN, as *E. coli* são sorotipadas com base em seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (K), sendo que a quantidade de diferentes antígenos identificados aumenta a cada ano. Até o momento foram identificados 171 diferentes antígenos O. Uma combinação específica de antígenos O e H define o sorotipo de uma linhagem, enquanto que na identificação perfunctória, apenas do antígeno O é possível a definição do sorogrupo da linhagem (NATARO & KAPER, 1998).

II. 2.1 Classificações de *E. coli*

De acordo com a patogenicidade, as *E. coli* (NATARO & KAPER, 1998) foram classificadas em 7 classes:

ETEC – enterotoxigênica
EPEC – enteropatogênica
EHEC – enterohemorrágica
VTEC – produtora de verotoxina
EIEC – enteroinvasiva
EaggEC ou EAEC – enteroagregativa
DAEC – difusamente aderente

A classe STEC (“Shiga Toxin Producing” *E. coli*) ou VTEC (“Vero Toxin Producing” *E. coli*), estão associadas à doença em humanos e animais (KUHNER et al., 2000; BEUTIN et al., 2004).

KONOWALCHUC et al. em 1997 observaram pela primeira vez que VTEC produzia uma potente enterotoxina termolábil capaz de causar efeito citotóxico em células Vero (células de rim de macaco verde africano), então denominaram-na de verotoxina (VTEC).

Múltiplos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade da EHEC, incluindo a produção da proteína stx, na habilidade do patógeno em causar lesões nas microvilosidades da parede intestinal do hospedeiro (KARMALI, 1989; KUHNER et al., 2000). A *E. coli* apresenta dois tipos da proteína stx: stx tipo 1 (stx 1 ou VT1) e stx tipo 2 (stx 2 ou VT2); apesar de ser extremamente similar a stx 1 no modo de ação, estrutura e características bioquímicas, a stx 2 difere na capacidade de provocar doenças (SCOTLAND et al., 1985). Geralmente a stx 1 no epitélio intestinal de bovinos não causa citotoxicidade. As stx são proteínas que apresentam uma subunidade A (30-35 kDa) e cinco subunidades B (entre 7 e 11kDa). A subunidade A inibe a síntese proteica de células eucarióticas e as subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina aos receptores celulares (STROCKBINE et al., 1988).

O reconhecimento da VTEC como uma classe de *E. coli* patogênica resultou da análise de dois surtos epidemiológicos. O primeiro foi relatado por RILEY et al. (1983), que investigaram doenças gastrointestinais, caracterizadas

por uma severa dor abdominal, diarreia líquida com sangue, provocadas por um tipo específico de *E. coli* sorotipo O157: H7 nos Estados Unidos. Essa doença, denominada colite hemorrágica, foi associada com a ingestão de alimentos como “hamburgers” mal cozidos, em cadeias de restaurantes fast food. O segundo surto foi observado por KARMALI et al. (1983) que descreveram o isolamento de *E. coli* sorotipo O157:H7 de crianças com síndrome urêmica hemolítica (HUS) em Toronto, Canadá, e verificaram a presença, em um filtrado bacteriano, de uma substância letal para a cultura de células Vero (células de rins de macaco verde africano). Esta atividade foi denominada verotoxina (VT).

Ainda em 1983 O'BRIEN & LA VECK observaram que a atividade VTEC podia ser neutralizada por anticorpos específicos para a toxina Shiga, a principal citotoxina extracelular de *Shigella dysenteriae* e, passaram a referi-la como toxina “Shiga-like” (SLTEC) ou simplesmente STEC.

As linhagens virulentas e não virulentas de STEC têm o trato gastrointestinal de bovinos como um importante reservatório e, o consumo de carne crua ou mal cozida contaminada pelas fezes destes animais, ingestão de leite cru ou, ainda, pelo manuseio de materiais contaminados, são as formas de infecção para o homem (KUHNERT et al., 2000, STEVENS et al., 2002). Outra rota de infecção ocorre de pessoa a pessoa, tanto quanto consumo de verduras e água que tiveram contato direto com o agente de transmissão (CAPRIOLI et al., 2005). As STEC podem causar desde uma diarreia branda, sanguinolenta (colite hemorrágica) à síndrome hemolítica urêmica (HUS) em crianças e adultos, com maiores ou menores efeitos conforme as condições imunológicas do indivíduo (KRISHNAN et al., 1987; CRAY JR, et.al, 1996; JENKINS et al., 2003; BETTELHEIM et al., 2005). A HUS provoca a maior complicação das infecções, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, que pode estender-se a outros órgãos (CRAY JR, et al, 1996). A taxa de mortalidade é de 2-7% e uma taxa de seqüelas em longo prazo, como a insuficiência renal, lesões neurológicas ou hipertensão, de 12-30% (WHO, 1997).

Há mais de 400 sorotipos de STEC isolados de gado (BLANCO et al., 2004). A diversidade de *E. coli* comensal não-STEC presente na microflora intestinal bovina é de grande interesse, uma vez que esses organismos podem potencialmente adquirir genes de virulência pelo mecanismo de transferência horizontal de genes, via mobilidade genética de elementos, por exemplo, como fagos (HACKER & KAPER, 2000).

MOON et al. (1983) descreveram uma lesão intestinal produzida por *E. coli* como “attaching-and-effacing” (A/E), após observar a ligação íntima da bactéria à superfície apical do enterócito (“attaching”) e um entumescimento nas microvilosidades intestinais (“effacing”), produzindo uma enterotoxina termoestável (EAST1). Os genes cromossômicos de patogenicidade que codificam as lesões histopatológicas estão presentes em uma ilha de patogenicidade de 35.6kb, denominada por “locus of enterocyte effacement” (LEE) (MOON et al., 1983; Mc DANIEL et al., 1995; FRANKEL et al., 1998). Os LEE foram primeiramente descritos em EPEC E2348/69 por McDANIEL et al. em 1995, mas estão também presentes em EHEC, *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium* e em *E. coli* patogênicas em uma diversidade de espécies animais (FRANKEL et al., 1998). Os LEE de EPEC E234/69 contêm 41 frames abertos de leitura (ORFs) de mais de 50 aminoácidos (FRANKEL et al., 1998; ELLIOTT et al., 1998). Estes genes são organizados em três regiões principais com funções conhecidas. A região média contém os genes *eae* (que codificam a adesina intimina necessária no processo “attaching-and-effacing”) e o gene *tir* (que codifica um receptor para a intimina que é transportado para as células do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III), os produtos que estão envolvidos na aderência da vilosidade epitelial (FRANKEL et al., 1998). Os genes *eae* e *tir* são os que codificam o sistema de secreção tipo III (ELLIOT et al., 1998; FRANKEL et al., 1998). A terceira região dos LEE, situada abaixo dos genes *eae*, codifica diversas proteínas que são secretadas através do sistema de secreção tipo III, as mais proeminentes destas proteínas são EspA, EspB e EspD (FRANKEL et al., 1998).

GYLES et al. (1998) demonstraram que a presença dos fatores de virulência está relacionada aos sorotipos e parece ser independente da procedência de cepas isoladas. Assim, isolados de humanos e de bovinos pertencentes ao mesmo sorotipo exibem modelos similares de patogenicidade para os genes *ehx* (enterohemolisina) *eae* (“attaching and effacing”) e *slt* (“shiga-like toxin”), o que garante a possibilidade de transmissão, estabelecimento e colonização de humanos por linhagens de origem bovina.

Existe um número muito grande de sorotipos de EHEC, mas a *E. coli* O157:H7 é o protótipo desta categoria. *E. coli* O157:H7 pode causar grande surto de intoxicação alimentar, em humanos, decorrentes da ingestão de alimentos e água contaminados (RILEY et al., 1983; KARMALI et al., 1983; STEVENS et al., 2002), podendo ser encontrada na microflora intestinal de bovinos, suínos, caprinos, caninos, felinos e aves (BEUTIN et al., 1993), mas sem causar-lhes doença ou causando-lhes apenas uma diarreia branda; portanto, são meramente considerados um reservatório da bactéria O157 (ELDER & KEEL, 2000).

Não apenas do bovino contaminado, mas também do bovino aparentemente saudável foi possível o isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes (GRIFFIN & TAUXE, 1991) de rebanhos dos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Alemanha. A porcentagem de isolamento foi em torno de 1% em gado saudável e em maior proporção em gado com diarreia. Não somente a *E. coli* O157, mas também outras *E. coli* produtoras de toxina Shiga-like foram isoladas, incluindo sorogrupos reconhecidamente patogênicos para a espécie humana como O26 e O111. Dependendo das condições e da sobrevivência do patógeno nas fezes dos animais contaminados com *E. coli* O157:H7, estas fezes são uma importante fonte de reinfecção para o rebanho e contaminação para o meio ambiente (WANG et al., 1996; STEVENS, et al. 2002). Esta bactéria pode se manter viável na água por um longo tempo, contaminando grandes áreas de abastecimento rural, urbano e de lazer aquático (SWERDLOW, et al., 1992; WANG & DOYLE, 1998; CHALMERS et al., 2000; STEVENS et al., 2002; SOLOMON et al., 2002).

SCOTLAND et al. (1990) e WILSON et al. (1996) descreveram o isolamento de VTEC, de sorogrupo O157 e outros sorogrupos como por exemplo O26 em amostras de fezes de bovinos e também em fezes de seres humanos residentes nas fazendas leiteiras. Segundo os autores as cepas isoladas das duas fontes eram similares, reforçando a hipótese da transferência de cepas de VTEC do gado para o homem.

Além da carne, também o leite e derivados podem representar uma via de transmissão de VTEC para o homem (ANSAY & KASPAS, 1997; KEENE et al., 1997; BIELASZWSKA et al., 1998; CAPRIOLI et al., 2005).

VERNOZY et al.(2005) analisaram 1039 amostras de queijos produzidas com leite cru na França, os autores isolaram 32 cepas produtoras de verotoxina, sendo que entre estas 13 apresentavam apenas o gene *stx1*, 2 apenas o gene *stx2* e 17 o gene *stx1* e *stx2*. O gene *eae* foi encontrado em uma única amostra. Não foi encontrada uma única amostra do sorogrupo O157, mas foram detectadas vários outros sorogrupos (O6, O22, O76, O109, O162, O174, O175).

QUINTO & CEPEDA (1997) analisaram a incidência de *E. coli* enterotoxigênica, verotoxigênica e necrotoxigênica no queijo produzido com leite pasteurizado e com leite cru. Os autores concluíram que o queijo feito com leite cru é um importante veículo de *E. coli* toxigênica.

FURTADO (1994), citado por TEIXEIRA et al., (2007) definiu o soro lácteo como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, correspondendo a cerca de 90% do volume do leite, levando consigo 50 a 55% dos sólidos totais. TEIXEIRA et al (2007) constatou 90% das amostras de soro mussarela obtidas em diferentes regiões do estado de Minas Gerais contaminadas por *E. coli*.

STEPHAN et al (2008) analisaram 796 amostras de queijos suíços produzidos com leite cru, obtiveram uma alta porcentagem do gene *stx1* e *stx 2* enquanto o gene *eae* não foi encontrado, indicando que esses queijos podem ser um veículo de transmissão de STEC para o homem.

II. 2.2 *Escherichia coli* comensal

A *E. coli* faz parte da microflora gastrointestinal natural dos seres humanos e outros animais (NATARO & KAPER, 1998). Essas cepas de *E. coli* são consideradas comensais por se adaptarem passivamente com seu hospedeiro sem causar doenças, sendo que na sua maioria origina-se da *E. coli* do grupo filogenético A (RUSSO & JOHNSON, 2000).

A diferença entre comensalismo e virulência é resultado da presença de fatores de virulência e expressão desses fatores pela bactéria (SELANDER et al., 1980). Os genes de virulência estão localizados em plasmídios, bacteriófagos ou no cromossomo bacteriano e tem sido demonstrado a possibilidade de transferência horizontal entre distintas linhagens de *E. coli* (HACKER & KAPER, 2000).

Dos 171 sorogrupos O identificados, 60 deles foram encontrados na espécie humana, e destes 60, cerca de 25 fazem parte da microbiota intestinal normal, e a maioria também está associada à infecção urinária, meningite e bacteremia. Os outros 35 sorogrupos são agentes de infecções intestinais (NATARO & KAPER, 1998).

II. 2.3 *E. coli* extraintestinal (ExPEC)

A *E. coli* extraintestinal é a causa mais comum de infecção do trato urinário (ITU), um grupo heterogêneo de desordens que, coletivamente causam morbidade considerável, levando a perda de produtividade e aumentando os custos de cuidados com a saúde (PATON et al, 1991).

O principal risco oferecido pela colonização das ExPEC no intestino humano seria a transferência horizontal dos fatores de virulência, que podem converter as cepas comensais em potenciais cepas patogênicas. Os fatores responsáveis por esse processo representam um mistério para a comunidade científica (JOHNSON et al, 2001).

Os genes para múltiplos fatores de virulência frequentemente estão juntos em grandes blocos de cromossomos chamados ilhas de patogenicidade (PAIs) (RUSSO & JOHNSON, 2000). Presume-se que os genes para os FVs unem-se nessas PAIs pois ganham vantagens quando presentes em grupo e sendo assim são transmitidas horizontalmente para outra bactéria (JOHNSON & RUSSO, 2002).

As PAIs, descritas pela primeira vez por HACKER et al (1983), foram encontradas em uma região do DNA (> 30 kb) que está associada com organismos patogênicos e não são comumente encontrados no genoma de *E. coli* fecal. Em 2001 GUYER et al identificaram dois tipos de PAI: PAI I que carrega o “operon” para os genes *pap* e *hly* os quais codificam fimbria P e hemolisina, respectivamente, e PAI II que possui uma segunda cópia do operon *pap*, genes envolvidos no transporte de ferro e os que codificam o auto-transporte e secreção de toxinas.

Alguns genes encontrados nos PAIs são denominados de *pap* (pili associado a pielonefrite), *sfa* (adesina S fimbria) e *afa* (adesina afimbrial) os quais são transcritos em um único segmento de RNA mensageiro e regulados por um conjunto de DNA (um operon). Os operons são comumente encontrados, em sua maioria codificando P ou F, S ou *afa* (também designada Dr hemaglutinina) adesinas, respectivamente (BLANCO et al, 1997).

II. 3. Antimicrobianos e suas Resistências

Em 1905 Paul Ehrlich demonstrou a possibilidade da síntese de certas substâncias capazes de danificar especificamente as células do microrganismo infectante, sem prejuízo para a saúde do hospedeiro. Ehrlich introduziu o conceito de índice quimioterápico – relação entre a dose máxima tolerada e a dose mínima curativa: o que propriamente caracteriza a quimioterapia é o emprego de substâncias dotadas de alto parasitotropismo e baixo organotropismo, portanto de índice quimioterápico elevado (BIER, 1985).

A quimioterapia antimicrobiana começou em 1935, com a descoberta das sulfonamidas. Em 1940, foi demonstrado que a penicilina, descoberta em 1929, poderia ser uma substância terapêutica eficaz. Durante os 25 anos seguintes as pesquisas de agentes quimioterápicos concentraram-se nas substâncias de origem microbiana, denominadas de antibióticos. O isolamento, a concentração, a purificação e a produção da penicilina em grande escala foram sucedidos pelo desenvolvimento da estreptomina, das tetraciclina, do cloranfenicol e de muitos outros agentes. Essas substâncias foram originalmente isoladas dos filtrados dos respectivos cultivos de bolores. Posteriormente, outros antibióticos foram sintetizados e, nesses últimos anos, a modificação biossintética das moléculas passou a constituir um método promissor na elaboração de agentes antimicrobianos novos (JAWETZ et al, 1998).

Antes que um antibiótico possa agir, ele deve interagir primeiro com alguma parte do microrganismo patogênico em um hospedeiro. A interação pode ser iniciada por um processo de transporte ativo específico da célula, que serve para aumentar a concentração intracelular “livre” do antibiótico, além daquela que seria atingida por difusão passiva. A concentração intracelular do antibiótico é determinada pelo equilíbrio entre influxo e efluxo, não havendo necessidade de ligação específica da droga a nenhum componente intracelular (JAWETZ et al, 1998).

A explicação de como o antibiótico atua envolve um ou mais fenômenos biofísicos ou bioquímicos muito específicos, que ocorrem na bactéria. Para o sucesso da quimioterapia é preciso que o processo metabólico a ser atacado no microrganismo seja o mais diferente possível do hospedeiro, e que a lesão real que faz ou pode ser feita ao paciente pelo antimicrobiano deve ser pesada em função do grau de risco para sua vida (YOUMANS et al, 1983).

O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente elucidado, todavia, esses mecanismos podem ocorrer através da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de

proteínas (inibição da tradução e transcrição do material genético) ou inibição da síntese de ácidos nucléicos (JAWETZ et al, 1998)

O surgimento e a disseminação de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias são considerados atualmente como um sério problema de saúde pública, e o controle dessa disseminação como um desafio à ciência (COHEN, 2000). Uma pressão seletiva favorecendo os genótipos resistentes a antimicrobianos é exercida sempre que estas drogas são utilizadas de forma terapêutica para o tratamento de infecções em Medicina humana e veterinária. Como uma consequência desta pressão seletiva e devido ao uso indiscriminado destas drogas nas últimas décadas ocorreu um aumento extraordinário do nível de resistência a agentes antimicrobianos apresentado pelas bactérias de origem humana ou de outros animais (ANGULO et al., 2000; TEUBER, 2002; LEVY, 2002).

Evidências clínicas e microbiológicas indicam que as bactérias resistentes podem ser transmitidas a partir dos animais para o homem, resultando em infecções que são difíceis de serem tratadas, assim a seleção de um gene de resistência à droga antimicrobiana em animais de criação intensiva (frango, porco, bovino, caprino, ovino) podem aumentar a incidência de patógenos humanos de origem animal apresentando multiresistência. Tem se observado resistência antimicrobiana de várias bactérias isoladas de porcos, galinhas, vacas como a *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Clostridium* sp, entre outras. A transmissão destes microrganismos para o homem resulta do contato direto com o animal, com suas fezes ou a partir da ingestão de alimentos (YOUNG, 1994; Van den BOGAARD & STOBBERING, 2000).

O nível de resistência apresentado pelas bactérias comensais tem sido proposto como um índice indicativo adequado para a avaliação da resistência a antimicrobianos apresentada pelas populações bacterianas, bem como um índice de avaliação da exposição destas bactérias as diferentes drogas antimicrobianas (CAPRIOLI et al., 2000). Além disso, a aquisição de resistência pelas bactérias comensais é motivo de preocupação, pois a microbiota pode atuar como um

reservatório potencial de genes de resistência a drogas antimicrobianas, as quais podem ser transferidas para uma bactéria patogênica dentro de um hospedeiro (SUMMERS, 2002).

II. 3.1 Grupos de Antimicrobianos

II. 3.1.1 Betalactâmicos

Os betalactâmicos são compostos que contêm um núcleo básico comum, o anel betalactâmico. Todos os betalactâmicos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana e, portanto, são ativos contra bactérias em crescimento. Esta inibição constitui apenas uma das atividades desses agentes, embora seja a mais compreendida. A etapa inicial na ação farmacológica consiste na ligação do fármaco aos receptores celulares (“proteínas de ligação da penicilina”, PBPs ou penicillin – binding proteins), logo a reação de transpeptidação é inibida, e a síntese de peptidoglicano é bloqueada. A próxima etapa provavelmente envolve a remoção ou inativação de um inibidor de enzimas autolíticas na parede celular. Isso ativa a enzima lítica e resulta em lise, se o ambiente for isotônico. Num meio acentuadamente hipertônico, as bactérias transformam-se em protoplastos ou esferoplastos, envolvidos apenas pela membrana celular. Existem vários tipos de PBPs e cada antibiótico pode ter especificidade maior por um ou vários tipos de PBP. Por atuarem na mesma membrana, porém em sítios diferentes, tais antibióticos, quando associados, podem demonstrar efeito aditivo. As PBPs estão sob controle cromossômico, e a ocorrência de mutações pode alterar seu número ou sua afinidade por fármacos betalactâmicos (JAWETZ et al, 1998).

São considerados betalactâmicos os seguintes antibióticos: penicilina (Ampicilina), cefalosporinas de primeira geração (cefalotina), segunda geração (cefuroxina e cefoxitina), terceira geração (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), quarta geração (cefepina), monobactâmico (aztreonam) e carbapenem (Imipenem).

A resistência a este grupo pode se dar por mutações cromossomais da PBPs, por mutação dos canais de porina, levando a uma diminuição da permeabilidade da parede celular bacteriana ou pela produção de enzimas inativadoras do anel betalactâmico (PELCZAR Jr. et al, 1997).

II. 3.1.2 Aminoglicosídeos

Quimicamente os aminoglicosídeos consistem em um amino-açúcar e em uma estrutura em forma de anel denominada aminociclitol (PELCZAR Jr. et al, 1997).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos consiste em induzir a síntese anormal de proteínas que se dá através de quatro etapas: ligação do aminoglicosídeo a uma proteína específica da subunidade 30S do ribossomo microbiano, bloqueando a atividade do complexo de inibição para a formação de peptídeos. Após isto a leitura pelo RNAm é feita equivocadamente resultando na formação de uma proteína não-funcional. Em sua última etapa a ligação do aminoglicosídeo resulta na quebra dos polissomas em monossomas incapazes de sintetizar proteínas. Estes eventos ocorrem levando a bactéria à morte (JAWETZ et al, 1998).

Como exemplo de aminoglicosídeos podemos citar: amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina, etc.

A resistência aos aminoglicosídeos quando de origem cromossômica está relacionada a uma perda ou alteração de uma proteína específica da subunidade 30S do ribossoma bacteriano (sítio de ligação em microorganismos susceptíveis). Uma outra forma de resistência consiste em um “defeito de permeabilidade”, reduzindo o transporte ativo da droga para o interior da célula, geralmente essa resistência é mediada por plasmídios. Além disso, bactérias gram negativas podem se tornar resistentes, devido a um plasmídio, produzindo enzimas (inativadoras) de adenilação, fosforilação ou acetilação, que destroem os fármacos (JAWETZ et al, 1998).

II. 3.1.3 Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos de amplo espectro, que possuem um sistema de anel complexo. Formam um complexo insolúvel com diversos íons metálicos e o fato de possuírem interação com o cálcio e outros sais presentes na dieta levam a uma má absorção destes elementos quando utilizada por via oral (YOUMANS et al, 1983).

As tetraciclina agem inibindo a síntese protéica em nível ribossômico podendo atuar tanto nos ribossomos bacterianos como de mamíferos, porém possuem ação mais intensa na subunidade 30S dos sistemas bacterianos. Por possuírem ação reversível e até inibida quando na remoção do fármaco, as tetraciclina podem ser consideradas bacteriostáticas (JAWETZ et al, 1998).

Mudanças na permeabilidade ao fármaco são as principais formas de resistência dos microrganismos, resultando em alterações na permeabilidade do envoltório celular microbiano. Em organismos resistentes, o fármaco não é transportado ativamente para o interior da célula, ou é rapidamente excluído antes que atinja concentrações inibidoras. De modo geral esta resistência é controlada por plasmídios (JAWETZ et al, 1998).

II. 3.1.4 Quinolonas

As quinolonas surgiram na década de 60 com o uso do ácido nalidíxico, sendo amplamente utilizados, especialmente em infecções urinárias. Na década de 80 surgiram as fluorquinolonas (norfloxacina), com indicação limitada para infecções do trato urinário e gastrointestinais.

As quinolonas agem inibindo uma enzima chamada DNA - girase, que é responsável pelo superespirilamento do DNA bacteriano, para que o mesmo possa ser acomodado dentro da célula bacteriana em divisão. Assim, a falta dessa enzima faz com que o DNA fique alongado causando o rompimento da bactéria.

Por este motivo podem ser consideradas drogas bactericidas (LOMAR & DIAMENT, 1998).

Mutações na formação da enzima DNA – girase ou diminuição na permeabilidade da parede celular são as principais formas de aquisição de resistência bacteriana às quinolonas (LOMAR & DIAMENT, 1998).

II. 3.1.5 Sulfonamidas

O surgimento das sulfonamidas se deu na década de 30, sendo considerados os primeiros antimicrobianos eficazes. Todas possuem uma mesma estrutura central, que é importante, pois se assemelha à estrutura de um composto bioquímico natural denominado ácido para aminobenzoico (PABA). Muitas bactérias requerem o PABA como um precursor do ácido tetraidrofólico (THFA), que é capaz de sintetizar aminoácidos e timina, um componente essencial ao DNA.

Por serem análogos estruturais do PABA, as enzimas bacterianas são muitas vezes “enganadas”. Isto resulta numa inibição competitiva da atividade da enzima, no caso a diidropteroato sintetase e por conseqüência o THFA não será produzido pela célula, assim as sulfonamidas podem ser consideradas compostos bacteriostáticos (JAWETZ et al, 1998).

Sua combinação com o trimetropin produz o bloqueio seqüencial aumentando bastante o efeito bactericida. O trimetropin é um agente antimicrobiano sintético análogo estrutural da porção pteridina do ácido diidrofólico (DHFA) e uma enzima bacteriana denominada diidrofolato redutase que pode ser facilmente enganada (PELCZAR Jr. et al, 1997).

Microrganismos se tornam resistentes às sulfonamidas quando desenvolvem uma via metabólica alternativa, que se desvia da reação inibida pelo fármaco.

Já no caso do trimetropin os microrganismos resistentes elaboram uma enzima modificada que tem a capacidade de desempenhar sua função metabólica,

embora seja menos afetada pelo fármaco do que a enzima no microrganismo susceptível (JAWETZ et al, 1998).

II. 3. 2 Origem da Resistência

A origem da resistência aos fármacos pode ser:

- **Origem não genética:** de um modo geral a replicação ativa das bactérias é necessária para a maioria das interferências dos agentes antibacterianos. Conseqüentemente, os microrganismos que estão metabolicamente inativos (sem multiplicação) podem ser fenotipicamente resistentes aos fármacos. Todavia, os descendentes são totalmente susceptíveis. Microrganismos podem perder a estrutura do alvo específico para um fármaco em várias gerações, tornando-se assim, resistentes.

- **Origem genética:** a grande maioria dos microrganismos resistentes a fármacos surge em consequência de alterações genéticas e processos subsequentes de seleção pelos agentes antimicrobianos, podendo ser:

- Resistência cromossômica: desenvolve-se em consequência de mutação espontânea em um locus que controla a susceptibilidade a determinado agente antimicrobiano. A presença do antimicrobiano atua como mecanismo seletivo, suprimindo os microrganismos susceptíveis e permitindo o crescimento dos mutantes resistentes aos fármacos.

- Resistência extracromossômica: as bactérias quase sempre contêm elementos genéticos extracromossômicos denominados plasmídios que transportam genes para resistência a um ou, quase sempre, vários agentes antimicrobianos. Genes plasmidiais para a resistência antimicrobiana frequentemente controlam a formação de enzimas destruidoras desses agentes antimicrobianos. O material genético e os plasmídios podem ser transferidos através da transdução, transformação, conjugação ou transposição (JAWETZ et al, 1998).

III. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Verificar a incidência de *E. coli* no queijo mussarela artesanal produzido no Vale do Jequitinhonha (Nordeste de Minas Gerais, Brasil).
- Verificar a presença dos genes *stx 1* e *stx 2*, características de cepas STEC, e a presença do gene *eae* da intimina através de PCR.
- Verificar a presença dos genes *pap*, *afa*, *sfa* característicos de cepas ExPEC através de PCR.
- Realizar a identificação do sorogrupo O157 das cepas STEC confirmadas no PCR como produtoras de shiga-toxina.
- Determinar a resistência das cepas isoladas frente a 12 agentes antimicrobianos.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. 1 Amostras de queijo

Neste estudo foram analisadas 59 amostras de queijo mussarela produzidos artesanalmente com leite não pasteurizado, coletadas em uma fazenda no Vale do Jequitinhonha (Nordeste de Minas Gerais, Brasil), no período de julho 2004 à janeiro de 2006. A produção diária nesta propriedade é de cerca de 100Kg, conforme foi relatado pelo produtor.



Figura 2 – Localização da propriedade onde foram coletadas as amostras do queijo mussarela artesanal.

Foram realizadas quatro coletas, cada uma com 15 amostras de queijo em julho/2004, janeiro/2005, julho/2005, janeiro/2006 (1 amostra foi perdida, total 59 amostras). Todas as amostras não apresentavam informações sobre data de fabricação ou prazo de validade. As amostras coletadas foram transportadas sob

refrigeração (4-6°C) dentro de caixas térmicas contendo blocos de gelo, sendo processadas no mesmo dia.

IV. 2 Isolamento e identificação de *E. coli*

Uma porção de 25 gramas de cada amostra de queijo foi misturada com 225 ml de caldo nutriente (Difco, Detroit, Michigan) sendo triturada por dois minutos em liquidificador, e incubada a 37°C por 24 horas (READ et al., 1990). Um ml da amostra em caldo nutriente foi adicionado a 9 ml de caldo MacConkey e incubado a 37°C por 24 horas, posteriormente uma alçada deste crescimento foi estriada em ágar MacConkey. Cinco colônias de cada placa com morfologia típica de *E. coli* foram identificadas por testes bioquímicos confirmatórios (KONEMAN et al., 1997). Essas colônias foram semeadas com auxílio de uma agulha de semeadura em meio Tríplice de açúcar e ferro (TSI) picando-se o meio até o fundo do tubo e fazendo estrias no ápice e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura mostrou uma identificação presuntiva de *E. coli* com a fermentação dos 3 açúcares existentes no TSI (lactose +, sacarose +, glicose +, com produção de gás). A fermentação desses açúcares levou a produção de ácidos e modificou a cor do TSI passando de alaranjado (cor original do meio) para amarelo. A confirmação foi realizada com a série bioquímica:

a) INDOL: um dos produtos do metabolismo do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de degradar o triptofano com produção de indol, ácido pirúvico e amônia. O indol pode ser detectado em meio apropriado através do desenvolvimento da cor vermelha, após a adição de uma solução contendo p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Ehrlich ou de Kovacs). Para testar o indol, o microrganismo foi inoculado com o auxílio de uma agulha de semeadura em tubos de ensaio contendo o caldo triptofano, e incubado a 37°C por 24 horas. Ao término deste período foram adicionadas 15 gotas de reativo de Kovacs pela parede do tubo. O desenvolvimento de uma cor

vermelha brilhante na superfície de contato entre o reativo e o caldo triptofano indica a presença de indol.

b) LISINA: as descarboxilases são um grupo de enzimas substrato-específicas, capazes de atuar sobre a porção carboxila (COOH) dos aminoácidos, formando aminas de reação alcalinas, a lisina produz a cadaverina.

c) UREASE: os microrganismos que possuem a enzima urease têm a capacidade de hidrolisar a uréia com liberação de amônia. O teste de uréia é feito a partir de tubo inclinado, com inóculo semeado na superfície, após 24 horas de incubação a 37°C, indica a presença de uréase com a mudança de cor amarela para rosa na superfície do ágar.

d) CITRATO DE SIMMONS: determina se um microrganismo é capaz de utilizar o citrato como uma única fonte de carbono e o fosfato de amônia como única fonte de nitrogênio para seu crescimento com conseqüente alcalinização, evidenciando pela alteração da cor verde do meio para azul, devido à presença do indicador azul de bromotimol no meio. A cepa é semeada sobre a superfície inclinada do meio, e após 24 horas de incubação a 37°C, o não crescimento da bactéria deixa o meio inalterado indicando prova negativa (KONEMAN et al 1997., TOLEDO et al., 1982).

IV. 3 Conservação das cepas de *E. coli*

Após o isolamento, cada uma das cepas obtidas foram conservadas de duas maneiras:

1. Por meio de repique semanal em placa de Petri ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio LB e conservado a 4°C em geladeira.

2. Em freezer a -20°C em tubos de plástico de microcentrífuga contendo 50% de um crescimento bacteriano em LB líquido e 50% de uma solução de glicerol a 70%.

IV. 4 Extração de DNA Template

A extração do DNA foi realizada segundo a técnica descrita por KESKIMAKI et al. (2001) onde as cepas de *E. coli* eram crescidas, em tubos contendo 2ml de caldo BHI overnight. Após o crescimento, 1ml desta cultura era transferida para um eppendorf e precipitadas a 12000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante era descartado e o pellet, formado por células bacterianas, era ressuspendido em 500µl de água de Milli Q autoclavada. Agitava-se bem em vortex para completa diluição e era levado novamente à centrifuga a 12000 rpm por 1 minuto, após 2 lavagens o sobrenadante era novamente descartado e o pellet de células ressuspendido em 250µl de água ultra pura autoclavada.

Os eppendorfs contendo a suspensão de células bacterianas eram levados em água em ebulição a 100°C por 10 minutos para rompimento da célula bacteriana e liberação do material genético (DNA). Após retirados da fervura eram centrifugados a 12000 rpm por 30 segundos. Do sobrenadante era retirada uma alíquota de 150 µl do sobrenadante e transferido para um novo eppendorf onde era levado para a conservação em freezer a -20°C .

O sobrenadante foi utilizado na reação de PCR para determinação dos genes de virulência (*stx 1*, *stx 2* e *eae*) e dos três operons fimbriais *pap*, *afa* e *sfa*,

IV. 5 Amplificação através da técnica de PCR

A determinação dos genes de virulência *stx 1*, *stx 2* e *eae* foram realizados conforme CHINA et al (1996) e a seqüência de bases (primers) e o tamanho dos segmentos específicos dos genes *stx 1*, *stx2* e *eae* amplificados estão apresentados na Tabela 1.

Os primers utilizados foram adquiridos da IDT (Integrated DNA Technologies, Inc). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em 50µl contendo 4 µl de amostra do sobrenadante, 0,5 µl de cada primer (total 3,0 µL), 0,2mM (cada) dATP, dGTP, dCTP,dTTP, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl e 1,5U de Taq polimerase (Biol). Esta mistura foi submetida a um termociclador (Eppendorf Masterycler) a 94°C por 5 minutos (desnaturação) seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão). No último ciclo, a última fase foi realizada por um tempo maior (10 minutos) para a completa extensão pela Taq polimerase. Foram utilizados como controle a cepa EDL 933 (O157:H7, stx1, stx2, eae) e DH5α (controle negativo).

Tabela 1- Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *stx* 1, *stx* 2 e *eae*.

Primers	Seqüência de nucleotídeos	Tamanho do produto de amplificação (pb)
eae B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	570
eae B53	CCATCGTCACCAGAGGA	
stx1 B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388
stx1 B55	TTGCCCCCAGAGTGGATG	
stx 2 B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807
stx 2 B57	GACATTCTGGTTGACTCTCTT	

Na reação da PCR foi utilizado os seguintes reagentes:

DNA template.....	4µL
Taq.....	1,5µL
Tampão.....	5,0µL
DNTP(2Mm).....	5,0µL
Primer (0,5 µl cada).....	3,0µL
H ₂ O.....	31,5µL
Total.....	50,0µL

Obs: o gel utilizado na eletroforese foi o TAE 1,5% e a voltagem de 100V por 1 hora.

Foram utilizados três jogos de primers sintetizados pela Invitrogen, cada um dos jogos de primers foi utilizado para amplificação de um dos três operons fimbriais estudados, *pap*, *afa*, *sfa*. O PCR foi realizado em um volume de 50 µl contendo 10 µl do DNA template, 0,5 µm de cada dos primers, 200 µm de cada um dos quatro deoxinucleotideo trifosfato, 10mM Tris HCL (pH 8,3) 1,5 M Mg Cl₂ e 2U de Taq polimerase (Biotol). A amplificação por PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Segundo o protocolo estabelecido por LE BOUGUENEC et al (1992).

Após um dos dois processos de amplificação 10µl da mistura de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1,5%, e os produtos da reação foram visualizados após marcação com brometo de etídeo. Um controle da reação (branco) o qual continha todos os componentes da mistura de reação exceto o DNA molde foi incluído em cada reação do PCR.

Tabela 2 – Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *pap*, *sfa*, *afa*.

Primers	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do produto de amplificação (pb)
Pap 1	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328
Pap 2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
sfa 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
Afa 1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750
Afa 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	

IV. 6 O₁₅₇ Latex Aglutinação

As cepas de STEC confirmadas no PCR como produtoras de shiga-toxina (*stx*) foram sorotipadas para o antígeno O do sorogrupo O₁₅₇ usando o Kit teste O₁₅₇ Latex Aglutinação (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), onde uma alíquota da cepa era semeada sobre o cartão teste e sobre este, gotas do reagente. Para leitura observa-se a formação de grumos de aglutinação como sendo resultado positivo e não havendo a formação foi considerado resultado negativo para o sorogrupo O₁₅₇. A cepa EDL 933 foi usada como controle positivo.

IV. 7 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos

As cepas de STEC isoladas eram submetidas ao Antibiograma para a determinação do perfil de resistência bacteriano aos antimicrobianos. Foi utilizado o método de disco difusão conforme o NCCLS (2002).

O Ágar Müller Hinton (MHM), previamente esterilizado e resfriado era distribuído em placas de Petri esterilizadas (25X12 mm) na quantidade necessária (cerca de 40 ml) para formar uma camada de 5mm de espessura.

Foram utilizados doze antimicrobianos de uso corrente na terapêutica veterinária e humana como: Ácido Nalidíxico (30µg); Amicacina (30µg); Amoxicilina (10µg); Amoxicilina + Ácido clavulânico (30µg); Ampicilina (10µg); Cefalotina (30µg); Ceftriaxona (30µg); Ciprofloxacina (5µg); Cotrimoxazol (25µg); Estreptomicina (10µg); Gentamicina (10µg) e Tetraciclina (30µg).

Os inóculos das cepas foram preparados a partir da cultura que era reativada em placas contendo ágar LB, crescidas a 37°C/24h, e preparando uma suspensão bacteriana em tubos contendo caldo LB e levados em estufa a 37°C por cerca de 2 a 4 horas até obter o padrão 0,5 na escala de Mc Farland.

Após o crescimento, eram homogeneizados e, com auxílio de swab o inóculo era semeado em toda a superfície do MHM. Esperava-se a secagem da superfície e então os discos eram adicionados de forma equidistante e pressionados levemente sobre a superfície do meio de cultura, com auxílio de pinça. Em seguida, as placas invertidas eram levadas em estufa e incubadas a 37°C/18 a 24 horas.

As placas foram examinadas quanto à presença ou ausência de halo de inibição, ao redor dos discos, e a determinação do diâmetro do halo de inibição foi efetuada com auxílio de régua milimétrica. Os resultados foram interpretados como resistentes (R), intermediários (I) ou sensíveis (S), segundo a (NCCLS 2002).

IV. 8 Meios de cultura utilizados

Ágar MacConkey (Biobrás)

Composição (g/L):

Peptona	17,0
Polipeptona.....	3,0
Lactose.....	10,0
Sais biliares.....	1,50
Cloreto de sódio.....	5,0
Ágar.....	13,50
Vermelho neutro.....	0,03
Cristal violeta.....	0,001
Água destilada.....	1L
pH final.....	7,1

Esterilizado a 120°C por 20 minutos em autoclave.

Ágar Tríplice de Açúcar e Ferro (Triple Sugar Iron Agar) – Oxoid

Composição (g/L):

Extrato de carne.....	3,00
Extrato de levedura.....	3,00
Peptona.....	20,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Lactose.....	10,00
Sacarose.....	10,00

Glicose.....	1,00
Citrato de ferro.....	0,30
Vermelho de fenol.....	q.s.
Ágar.....	12,00
pH final.....	7,4.

Segundo instruções do fabricante, 65g do meio de cultura foram reidratados com 1000 mL de água destilada e em seguida levado a fervura para dissolver completamente, posteriormente foi distribuído em tubos de vidro 12X1 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Deixando o meio solidificar na posição inclinada.

Meio de Indol

Composição (g/L):

Caldo triptofano (triptofano a 1%)

Peptona ou digerido pancreático de caseína (tripticase).....	2,00
Cloreto de sódio.....	0,50
Água destilada.....	100,00 mL
pH final.....	8,00.

Foram misturados todos os itens acima para obtenção do caldo triptofano a 1%, em seguida foram distribuídos aproximadamente 3,0 mL do caldo em tubos de vidro de 10X1 cm e autoclavados a 121°C por 20 minutos (KONEMAN et al., 1993).

Reativo de Kovacs

Composição (mL):

Álcool amílico ou isomílico puro.....	150,00
P-Dimetilaminobenzaldeído.....	10,00
Ácido clorídrico concentrado.....	50,00

Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar) – Difco

Composição (g/L):

Sulfato de magnésio.....	0,20
Fosfato de amônio monobásico.....	1,00
Fosfato dipotássico.....	1,00
Citrato de sódio.....	2,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Ágar.....	15,00
Azul de bromotimol.....	0,08
pH final.....	6,8.

Segundo instruções do fabricante, 24,2g do meio de cultura foram reidratados com 1000 mL de água destilada e em seguida levado a fervura para dissolução completa, em seguida o meio foi distribuído em tubos de vidro de 10X1 cm e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Deixando o meio solidificar na posição inclinada.

Meio Luria Bertoni (LB)

Composição (g/L):

Triptona.....	10,0
---------------	------

Peptona.....	10,0
Extrato de levedura.....	5,00
Cloreto de sódio.....	10,00
Água destilada.....	1L.

O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio. O meio foi esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos a 1 atm de pressão. Quando utilizado em placa de Petri foi adicionado 15g/L de ágar.

Ágar Muller-Hinton (Muller-Hinton Agar) – OXOID

Composição (g/L):

Infusão desidratada de carne.....	300,00
Hidrolisado de caseína.....	17,50
Amido.....	1,50
Ágar.....	17,00.

Segundo instruções do fabricante, 38g do meio de cultura deverão ser dissolvidos em 1000 mL de água destilada e levados a ferver para dissolução completa, a seguir o meio foi esterilizado e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os queijos filados são considerados como um dos alimentos mais seguros para serem consumidos, no entanto o estudo de bactérias patogênicas que podem ser transmitidas pelo leite e derivados não mostra isso, o que indica ser necessário uma melhoria nas condições de higiene nas indústrias de leite e derivados.

Grande parte dos surtos de origem alimentar causados por *E. coli* são relacionados à contaminação fecal humana. Isto significa a provável exposição do alimento à água não tratada e contaminada com esgoto doméstico ou manipulação inadequada (BOPP et al., 2003).

No presente estudo foi detectada a presença de *E. coli* em 64,4% (38) das 59 amostras de queijo mussarela artesanal analisadas. Um total de 147 cepas de *E. coli* foram isoladas das amostras de queijo.

De julho de 2004 a janeiro de 2006 foram realizadas 4 coletas de queijo mussarela produzido de forma artesanal em 1 propriedade rural do Vale do Jequitinhonha. As coletas foram realizadas nos meses de julho/2004, janeiro/2005, julho/2005, janeiro/2006, sendo que em cada uma das ocasiões foram coletadas 15 queijos perfazendo um total de 59 amostras (1 amostra foi perdida). A partir de uma amostra de 25g de cada queijo, após o tratamento necessário para o crescimento bacteriano e isolamento de colônias bacterianas em placas de ágar MacConkey, foram selecionadas 147 cepas de *E. coli*, sendo 5 cepas provenientes de cada uma das placas de MacConkey correspondentes a semeadura das bactérias provenientes de uma amostra de queijo.

A porcentagem de cepas isoladas em cada uma das coletas está apresentada na figura 3.

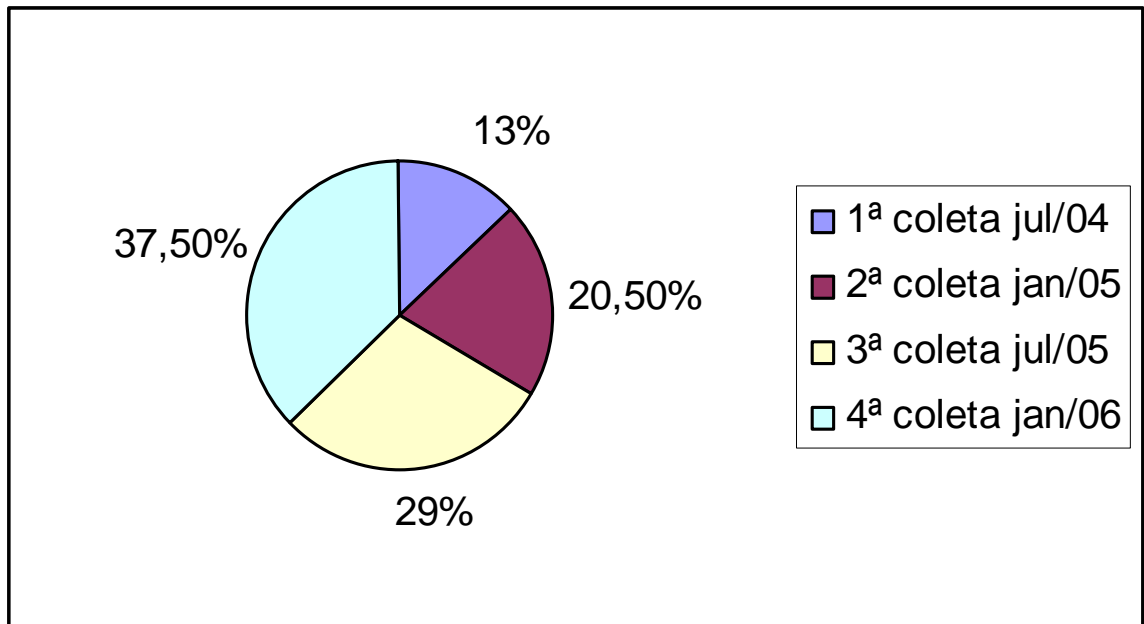


Figura 3 – Porcentagem de cepas de *E. coli* isolada de queijo mussarela artesanal, individualizado de acordo com cada coleta.

A presença de bactérias do grupo coliformes fecais nos alimentos é interpretada como indicador de contaminação fecal, ou seja de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Este índice de coliformes fecais é empregado tendo em vista que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *E. coli*. Sua presença indica a possibilidade de ocorrerem outros microrganismos entéricos na amostra (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Há muitos pontos relacionados com a contaminação do leite incluindo: condições inadequadas da ordenha, contaminação após o tratamento térmico, contaminação dos equipamentos, vasilhames inadequados, armazenagem ou ação do manipulador. A identificação da fonte de contaminação estava além do escopo deste trabalho uma vez que o nosso interesse era analisar o risco potencial dos queijos disponíveis para o consumo no comércio e caracterizá-los como veículos de disseminação de cepas diarréicas de *E. coli* ao alcance do consumidor final.

Os bovinos tem sido considerados como o principal reservatório de cepas STEC (PATON & PATON, 1998). Nesse sentido tem sido destacado que *E. coli* de sorotipo O157:H7 é considerada a principal responsável por infecções nos Estados Unidos e Canadá, existindo indícios de que as cepas STEC não-O157 possam também causar infecções nesses hospedeiros (BROOKS et al., 2005; JOHNSON et al., 2006).

OLIVEIRA et al (1998) observaram valores menores de contaminação do queijo mussarela produzidos em fábricas de laticínios do Estado de São Paulo, sendo que em 20 amostras (15%), apresentaram contaminação por *E. coli*.

SILVA et al (2002) analisaram 20 amostras de queijo mussarela produzido no estado de Minas Gerais, encontraram contaminação por *E. coli* em todas as amostras analisadas este resultado foi superior aos resultados encontrados nesse estudo, evidenciando de acordo com o autor falhas higiênico-sanitárias durante ou após o processamento.

No Brasil a produção e a comercialização de queijos artesanais representam uma importante fonte de renda para pequenos produtores, como forma de agregar valor à produção de leite. Porém muitas vezes a qualidade higiênico-sanitária do leite e derivados é duvidosa, a mão de obra para sua obtenção e fabricação não é qualificada, representando um risco à saúde do consumidor (ALBUQUERQUE et al., 2008).

ZAFFARI et al (2007) analisaram 80 amostras de queijos artesanais comercializados na região litorânea norte do Rio Grande do Sul, foi encontrada uma alta frequência de coliformes fecais e *Listeria monocytogenes*. Tal fato segundo o autor representa falhas higiênicas durante o processamento e estocagem do alimento representando um risco potencial ao consumidor.

ALBUQUERQUE et al., 2008 identificou coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia (Minas Gerais), de acordo com o autor a presença destes contaminantes pode ter ocorrido tanto no momento da obtenção da matéria prima quanto no momento da produção, transporte e armazenamento do produto final, sendo que em todos os

níveis de produção há necessidade de implantação de boas práticas de fabricação e controle dos processos e seus pontos críticos.

NICOLAU et al., 2004 analisou 208 amostras de queijo mussarela em diferentes etapas de processamento em três indústrias de laticínios em Goiás-GO, os resultados mostraram que a maior parte das linhagens de *S. aureus* isoladas durante o estudo eram provavelmente de origem humana, esse fato segundo o autor evidencia a importância do controle das condições higiênicas dos manipuladores e dos processos de higienização, desde a ordenha até o produto final.

As pessoas que manipulam os alimentos desempenham uma função importante na preservação da higiene dos mesmos. O estado de saúde das pessoas que trabalham em estabelecimentos de produtos alimentícios, assim como suas práticas higiênicas influenciam diretamente a qualidade final dos alimentos (LAGAGGIO et al., 2002).

Para efeito da inspeção sanitária de alimentos, qualquer pessoa que entra direta ou indiretamente em contato com substâncias alimentícias é considerada manipulador (RIEDEL, 1992).

Pode-se considerar também como um fator de contaminação dos alimentos a deficiente preparação profissional de alguns manipuladores, dedicados em muitas ocasiões a executar múltiplas tarefas além da manipulação dos alimentos. LAGAGGIO et al. (2002) afirmam que entre as medidas aplicáveis na prevenção de doenças transmitidas por alimentos, a educação e informação em higiene dos alimentos para manipuladores de alimentos é destacada, pois a maioria das pessoas que trabalham na manipulação de alimentos possui uma formação deficiente. Portanto, a metodologia dos programas de treinamento destinados a este público deve considerar suas limitações, a fim de que se atinja o objetivo de compreensão e a mudança de atitude do indivíduo frente ao seu trabalho. Os autores verificaram que após a realização de palestras sobre educação sanitária foi conseguida a redução da contaminação das mãos dos manipuladores de alimentos. Assim, deve ser realizado um monitoramento e capacitação constante

mantendo-se um nível adequado de higiene de indivíduos que atuam nos locais de manipulação de alimentos.

A seguir as 147 cepas de *E. coli* foram submetidas a técnica de PCR para a verificação da presença dos genes *stx 1*, *stx 2* e *eae* características das cepas STEC e dos genes *pap*, *afa* e *sfa* características das cepas ExPEC.

Entre as 147 cepas de *Escherichia coli* foram identificadas 16 cepas (10,8%) que apresentaram o gene *stx1* e dentre estas 13 delas também apresentaram o gene *eae*, sendo todas provenientes de 7 queijos analisados (18,4%) (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

Tabela 3 - Perfil de virulência em cepas STEC isoladas de queijo mussarela artesanal.

Cepas	Fator de virulência
10.8	<i>stx 1, eae</i>
61.4	<i>stx 1, eae</i>
62.1	<i>stx 1</i>
62.2	<i>stx 1</i>
62.3	<i>stx 1, eae</i>
62.5	<i>stx 1, eae</i>
62.6	<i>stx 1, eae</i>
62.7	<i>stx 1, eae</i>
64.1	<i>stx 1, eae</i>
64.2	<i>stx 1, eae</i>
64.6	<i>stx 1, eae</i>
66.8	<i>stx 1, eae</i>
66.9	<i>stx 1, eae</i>
66.10	<i>stx1, eae</i>
69.3	<i>stx 1</i>
90.4	<i>stx 1, eae</i>

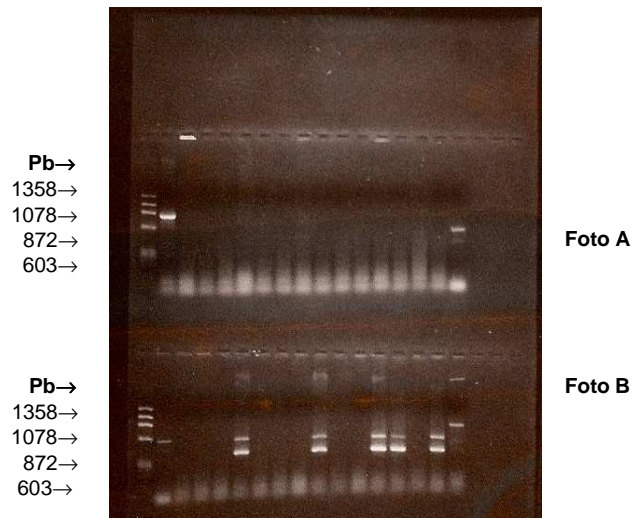


Figura 4. Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% para a detecção dos genes *stx 1* e *stx 2* e *eae* isolados de queijo mussarela.

FOTO A: Raia 1 – marcador de peso molecular $\emptyset \times 174$ digerido com Hae III; raia 2 cepa controle para o gene *stx 2*; raia 3 amostra 108.1 negativa; raia 4 amostra 3.1 negativa; raia 5 amostra 30.1 negativa; raia 6 amostra 36.6 negativa; raia 7 amostra 109.3 negativa; raia 8 amostra 95.3 negativa; raia 9 amostra 35.5 negativa; raia 10 amostra 104.5 negativa; raia 11 amostra 172.1 negativa; raia 12 amostra 161.5 negativa; raia 13 amostra 31.3 negativa; raia 14 amostra 163.1 negativa; raia 15 amostra 95.5 negativa; raia 16 amostra 36.3 negativa; raia 17 cepa controle para o gene *eae*.

FOTO B: Raia 1 – marcador de peso molecular $\emptyset \times 174$ digerido com Hae III; raia 2 cepa controle para o gene *eae*; raia 3 amostra 70.4 negativa; raia 4 amostra 168.4 negativa; raia 5 amostra 161.3 negativa; raia 6 amostra 66.10 *stx1+* *eae* positivo; raia 7 amostra 74.6 negativa; raia 8 amostra 166.1 negativa; raia 9 amostra 30.6 negativa; raia 10 amostra 62.3 *stx 1+* *eae* positivo; raia 11 amostra 71.2 negativa; raia 12 amostra 163.5 negativa; raia 13 amostra 10.8 *stx 1 + eae* positivo; raia 14 amostra 90.4 *stx 1+ eae* positivo; raia 15 amostra 74.5 negativa; raia 16 amostra 62.5 *stx 1 + eae* positivo; raia 17 amostra 2.9 *stx 2*.

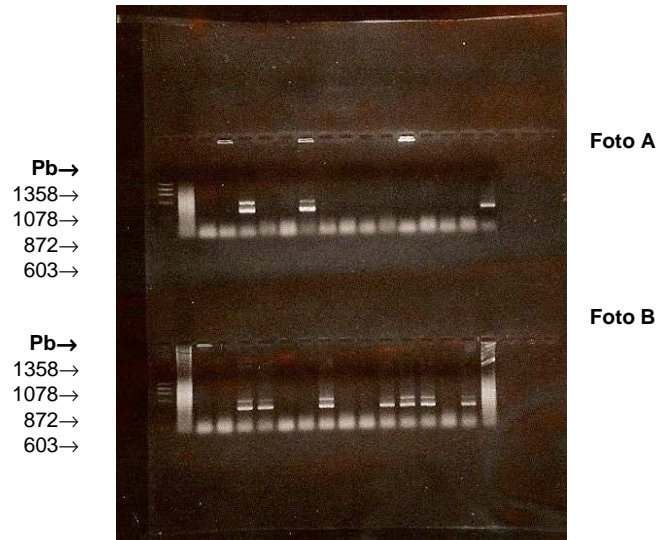


Figura 5. Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% para a detecção dos genes *stx 1* e *stx 2* e *eae* isolados de queijo mussarela.

FOTO A: Raia 1 – marcador de peso molecular Ø x 174 digerido com Hae III; raia 2 cepa 2.9 degradada; raia 3 amostra 37.5 negativa; raia 4 amostra 71.6 negativa; raia 5 amostra 61.4 *stx 1*+ *eae* positivo; raia 6 amostra 177.4 negativa; raia 7 amostra 143.3 negativa; raia 8 amostra 62.6 *stx 1*+ *eae* positivo; raia 9 amostra 174.1 negativa; raia 10 amostra 37.1 negativa; raia 11 amostra 89.2 negativa; raia 12 amostra 30.5 negativa; raia 13 amostra 66.1 negativa; raia 14 amostra 31.5 negativa; raia 15 amostra 117.4 negativa; raia 16 amostra 95.2 negativa; raia 17 amostra 96.3 *stx*.

FOTO B: Raia 1 – marcador de peso molecular Ø x 174 digerido com Hae III; raia 2 cepa 29.1 degradada; raia 3 amostra 95.4 negativa; raia 4 amostra 109.5 negativa; raia 5 amostra 66.9 *stx 1* + *eae* positivo; raia 6 amostra 64.1 *stx1*+ *eae* positivo; raia 7 amostra 122.4 negativa; raia 8 amostra 167.4 negativa; raia 9 amostra 64.2 *stx 1* + *eae* positivo; raia 10 amostra 162.4 negativa; raia 11 amostra 35.4 negativa; raia 12 amostra 62.1 *stx 1* + *eae* positivo; raia 13 amostra 64.6 *stx 1* + *eae* positivo; raia 14 amostra 62.7 *stx 1*+ *eae* positivo; raia 15 amostra 163.4 negativa; raia 16 amostra 61.4 *stx 1* + *eae* positivo; raia 17 cepa controle 46.2 para o gene *eae* degradada.

No presente trabalho todas as cepas STEC isoladas foram submetidas ao teste de soroaglutinação em latex, não foi detectado o sorotipo O157, sendo as cepas analisadas classificadas como STEC não-O157. Este resultado coincide com outros estudos realizados no Brasil, os quais apresentam uma baixa

freqüência deste sorotipo (GUTH et al., 2004; LIRA et al., 2004; IRINO et al., 2005).

Diferentes variedades de queijos têm sido evidenciadas com contaminação de STEC baseadas na presença de cepas STEC isoladas ou na presença do gene *stx* (PRADEL et al., 2000; VERNOZY-ROZAND et al., 2005; HONISH et al., 2005; PANETO et al., 2007; STEPHAN et al., 2008). Entre estes estudos, aqueles descritos por HONISH et al (2005) demonstraram a presença de STEC em queijo duro.

Embora os queijos duros sejam também considerados como de menor risco para o crescimento e sobrevivência de cepas patogênicas do que os queijos úmidos (frescos) (DONNELLY, 2004) a presença de STEC O157:H7 no queijo gouda foi detectada por HONISH et al (2005) após 104 dias de fabricação do queijo, mostrando o grande risco potencial de disseminação dessas cepas.

Estudos experimentais tem mostrado que o tratamento térmico em altas temperaturas como a filagem a 80°C por 5 min., durante a fabricação do queijo mussarela exercem um controle efetivo na eliminação das cepas de STEC (SPANO et al., 2003). No presente estudo a temperatura de filagem foi, segundo informações do fabricante, de 75-85°C durante 10 min. no mínimo, indicando um eficiente tratamento térmico.

Resultados semelhantes para a presença do gene *stx1* foram encontrados por PRADEL et al (2000) e VERNOZY-ROZAND et al (2005) em queijos franceses, exceto com relação a presença do gene *eae* praticamente ausente nos dois estudos.

Existe considerável evidencia epidemiológica para indicar que isolados STEC produtores de *stx 2* são mais associados com doenças graves do que isolados produtores de *stx 1* ou *stx 1* e *stx 2* (BOERLIN et al., 1999). No entanto cepas STEC portando somente o gene *stx 1* podem ser capazes de causar HUS (PATON & PATON, 1998).

Um dos fatores de virulência das cepas de VTEC é a capacidade de causar a lesão “attaching and effacing” na mucosa intestinal (PATON & PATON, 1998). O gene *eae*, responsável por essa lesão foi detectado neste estudo.

De acordo com BARRET et al., 1992 o gene *eae* pode ser necessário para aumentar a virulência de cepas STEC. Por outro lado o gene é encontrado em STEC não-O157 comumente isolada em humanos (LAW, 2000).

Isolados de animais não-O157 contém o gene *eae* menos frequentemente, o que em parte pode explicar o reduzido número de doentes em humanos (BARRET et al., 1992).

BEUTIN et al (1995) descreveram que apenas 1-4% das 208 cepas de STEC isoladas de animais saudáveis continham o gene *eae*. Apesar disso, considerando que a infecção por STEC não é completamente compreendida em seres humanos, todos os alimentos contaminados por STEC devem ser considerados veículos potencialmente perigosos.

Como foi relatado por BEUTIN et al (1995), o gene *eae* é freqüentemente associado a cepas não-O157 isoladas de humanos, e a maioria das cepas STEC isoladas no presente estudo mostraram possuir o gene *eae*, o que pode ser um indicativo da origem humana destas cepas contaminantes dos queijos, o que coloca o manipulador como o principal suspeito da origem das cepas isoladas. Neste momento esta sendo desenvolvido em nosso laboratório um trabalho para comprovar esta possibilidade.

Nas cepas de *E. coli* investigadas por PCR, não foram identificados os genes codificadores de adesinas (*pap*, *sfa* e *afa*) sendo portanto considerado negativo (Figura 6). A *E. coli* extraintestinal possui fatores de virulência que permitem invadir, colonizar e provocar doenças fora do trato gastrointestinal. Além de provocar doenças no homem cepas ExPEC também podem causar infecções extraintestinais em animais domésticos e animais de estimação (SMITH et al., 2007).

Cepas ExPEC tem sido isoladas de produtos alimentícios de origem animal, particularmente produtos a base de carne bovina e aves, indicando que estes

alimentos podem representar um veículo de disseminação dessas cepas. Uma preocupação com relação a essas cepas isoladas de alimentos tem sido a multiresistência a drogas antimicrobianas (JOHNSON et al., 2003; JOHNSON et al., 2005; SANTO et al., 2007).

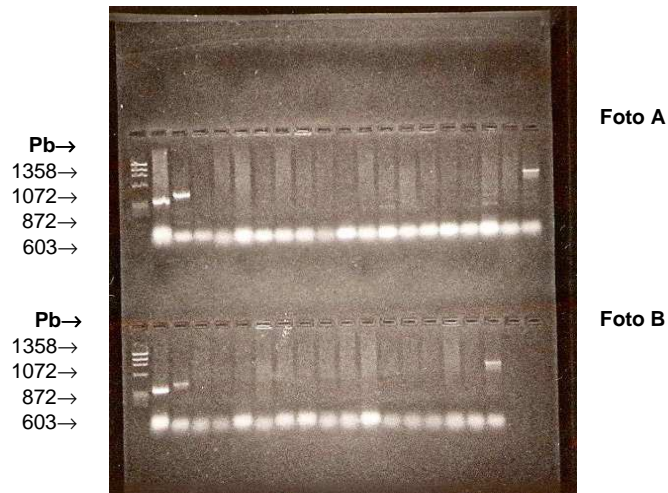


Figura 6. Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% para a detecção dos genes *pap*, *sfa* e *afa* isolados do queijo mussarela.

Foto A: Raia 1 – marcador de peso molecular $\emptyset \times 174$ digerido com Hae III; raia 2 controle positivo *sfa* +; raia 3 amostra 37.5 negativa; raia 4 amostra 71.6 negativa; raia 5 amostra 61.4 negativa; raia 6 amostra 177.4 negativa; raia 7 amostra 143.3 negativa; raia 8 amostra 62.6 negativa; raia 9 amostra 174.1 negativa; raia 10 amostra 37.1 negativa; raia 11 amostra 89.2 negativa; raia 12 amostra 30.5 negativa; raia 13 amostra 66.1 negativa; raia 14 amostra 31.5 negativa; raia 15 amostra 117.4 negativa; raia 16 amostra 95.2 negativa; raia 17 controle positivo para *afa*.

FOTO B: Raia 1 – marcador de peso molecular $\emptyset \times 174$ digerido com Hae III; raia 2 controle positivo *sfa* +; raia 3 amostra 95.4 negativa; raia 4 amostra 109.5 negativa; raia 5 amostra 66.9 negativa; raia 6 amostra 64.1 negativa; raia 7 amostra 122.4 negativa; raia 8 amostra 167.4 negativa; raia 9 amostra 64.2 negativa; raia 10 amostra 162.4 negativa; raia 11 amostra 35.4 negativa; raia 12 amostra 62.1 negativa; raia 13 amostra 64.6 negativa; raia 14 amostra 62.7 negativa; raia 15 amostra 163.4 negativa; raia 16 amostra 61.4 negativa; raia 17 controle positivo para *afa*.

O surgimento de resistência aos antimicrobianos entre os patógenos que apresentam um impacto na saúde animal tem sido considerada uma preocupação crescente em medicina veterinária (WHITE & MC DERMOTT, 2001). Membros da maioria das classes de antimicrobianos como as tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, penicilinas e cefalosporinas, tem sido usados a um longo tempo na medicina humana e na veterinária (PHILLIPS et al., 2004). Na alimentação animal os antimicrobianos são utilizados no controle de doenças e como estimuladores de crescimento, o que pode levar ao potencial desenvolvimento de espécies bacterianas resistentes e consequente transmissão para o homem através dos alimentos (WHITE & MC DERMOTT 2001; PHILLIPS et al., 2004).

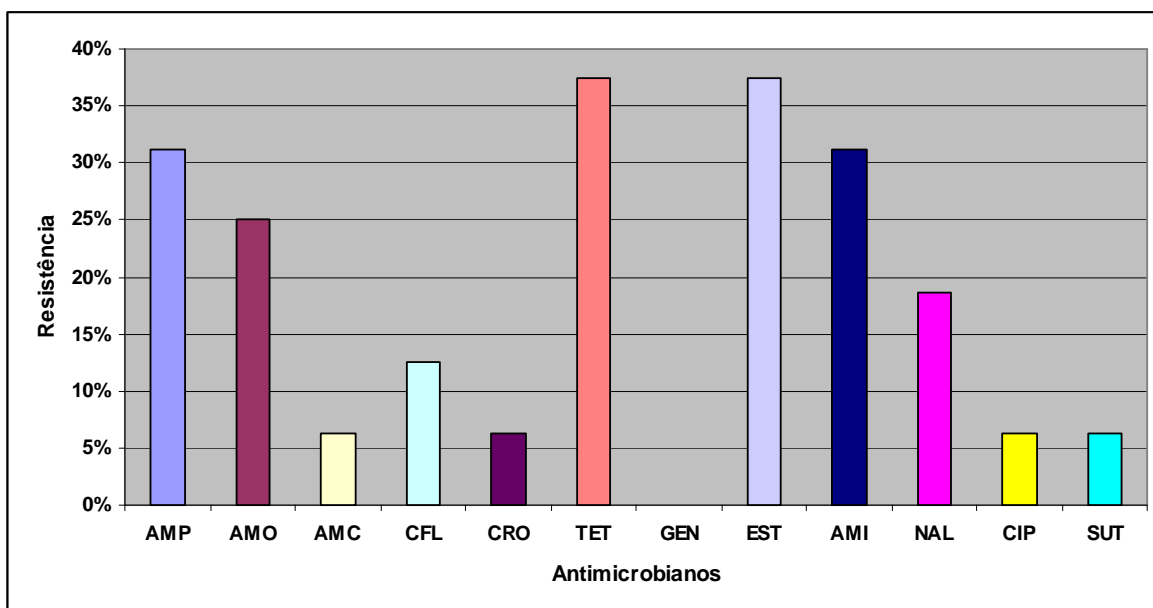


Figura 7 – Susceptibilidade antimicrobiana de 16 cepas STEC isolada de queijo mussarela artesanal.

AMP: ampicilina, AMO: amoxicilina, AMC: amoxicilina+ácido clavulânico, CFL: cefalotina, CRO: ceftriaxona, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, EST: estreptomicina, AMI: amicacina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SUT: cotrimoxazol.

Tabela 4 – Perfil de resistência antimicrobiana em cepas STEC isoladas de queijo mussarela artesanal.

Cepas	Fenótipos de resistência
10.8	AMP, AMO, CFL, TET, EST, AMI*
61.4	AMO, CFL, TET, EST
62.1	AMO, CFL, AMI, SUT
62.2	EST, TET
62.3	AMP, EST
62.5	TET, AMI
62.6	TET, NAL, AMI
62.7	EST, NAL, CIP
64.1	AMP, EST, AMI
64.2	**
64.6	AMP, TET, NAL
66.8	AMP, AMO
66.9	**
66.10	**
69.3	**
90.4	**

* AMP: ampicilina, AMO: amoxicilina, AMC: amoxicilina+ácido clavulânico, CFL: cefalotina, CRO: ceftriaxona, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, EST: estreptomicina, AMI: amicacina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SUT: cotrimoxazol.

** Sensível a todos os antimicrobianos testados.

Neste estudo foi observada a presença de cepas apresentando multiresistência a diversas classes de drogas antimicrobianas (MDR), incluindo betalactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas e cefalosporinas, entre as cepas STEC analisadas (tabela 4, figura 7). Esses resultados concordam com aqueles descritos por outros autores (MAIDHOF et al., 2002; LIRA et al., 2004; WASH et al., 2006), confirmando que a resistência para uma ampla variedade de classes antimicrobianas podem ocorrer entre as cepas STEC. Entre as 16 cepas STEC analisadas, cinco cepas (31,2%) eram MDR, o que é similar aos achados de MAIDHOF et al., 2002 em cepas STEC ou em *E. coli* comensal (RIGOBELLO et al., 2006).

Os resultados do presente trabalho revelaram que um grande número de cepas STEC isoladas eram resistentes aos aminoglicosídeos incluindo amicacina e estreptomicina, em concordância com outros autores (MORA et al, 2005).

A resistência a tetraciclina foi encontrada em 37,5% das cepas isoladas, o que é consistente com o trabalho de ZHAO et al (2001) e MORA et al (2005), que relataram a resistência a tetraciclina em 43% e 32% das cepas STEC respectivamente.

As tetraciclinas são drogas com um largo espectro de atividade, amplamente utilizados na medicina humana, veterinária, no setor agrícola e aquicultura. O primeiro fator de resistência para a tetraciclina foi identificado há mais de 40 anos no Japão, a partir daí houve um aumento de resistência o que levou a uma redução na eficácia desse antibiótico (CHOPRA et al., 2001).

No Brasil CERGOL-NOVELLA et al., 2006 analisaram 107 cepas STEC de diferentes origens, foi observado elevado índice de multiresistência. Foi descrito altos níveis de resistência para tetraciclina (90%) e estreptomicina (75%) para amostras de origem humana e sulphazotrin (88%) entre as amostras de origem animal.

WHITE et al. (2002), demonstraram que o nível de resistência em cepas patogênicas está aumentando. Os primeiros isolados clínicos de O157:H7 eram sensíveis a muitos antimicrobianos e a resistência a antibióticos era incomum

nestes isolados. Uma vez que antimicrobianos não são utilizados para o tratamento de infecção por O157 em humanos, pode-se supor que o aumento desta resistência pode ser devido ao uso de antimicrobianos no gado, o qual é considerado um reservatório natural para a O157 (WHITE et al., 2002; MAIDHOF et al., 2002; MORA et al., 2005; ZHAO et al., 2001).

Todas as cepas STEC isoladas durante este estudo foram sensíveis a gentamicina. LIRA et al., 2004 relatou o isolamento de cepas STEC em vacas com mastite sensíveis a gentamicina, o que é compatível com os resultados obtidos neste estudo.

Entre as quinolonas foram encontradas resistências em 1 (6,25%) e 3 (18,7%) das cepas STEC respectivamente, para a ciprofloxacina e o ácido nalidíxico, o que está de acordo com o relatado por LIRA et al (2004).

O isolamento de cepas resistentes a antimicrobianos utilizados na medicina humana provenientes de gado com mastite (TURNIDGE, 2004) ou do queijo feito com leite cru (PANETO et al., 2007) tem sido motivo de preocupação devido aos riscos de disseminação destes genes para a microbiota humana.

Embora a incidência de infecção por STEC em humanos, seja relativamente baixa, a severidade dos sintomas e a frequência de sequelas renais, neurológicas e a morte de pessoas são motivos de preocupação.

A presença de cepas STEC nas amostras analisadas, o alto nível de resistência a antimicrobianos e o elevado nível de multiresistência representa um motivo de preocupação, devido ao grande consumo de queijo feito com leite cru pela população nas áreas rurais. Torna-se necessário, portanto, a implementação de programas de controle de qualidade do leite, capacitação dos manipuladores e melhoria das condições higiênico-sanitárias para a produção dos queijos. Além disso, devem ser adotadas medidas de controle ao uso de antimicrobianos nos animais, para que dessa forma seja minimizada a ocorrência de cepas resistentes e conseqüentemente a disseminação dessas para o ambiente.

VI. CONCLUSÕES

- A frequência de *E. coli* isoladas de queijo mussarela no Vale do Jequitinhonha (Nordeste de Minas Gerais) é de 64,4% (38/59);
- Das 147 amostras de *E. coli* isoladas, 16 (10,8%) possuem o gene da shiga toxina (*stx 1*) e 13 dessas também o gene da intimina (*eae*);
- Não foi isolada *E. coli* produtora de *stx 2*;
- Não foi isolada nenhuma cepa de *E. coli* O157 entre as STEC analisadas;
- Entre as cepas de *E. coli* estudadas não foram identificados os genes codificadores de adesinas (*pap*, *sfa*, *afa*), portanto não foi identificada nenhuma cepa ExPEC;
- As cepas de *E. coli* produtoras da shiga toxina isoladas, apresentaram multiresistência a diversas classes de antimicrobianos testados, especialmente aminoglicosídeos, betalactâmicos e tetraciclina;
- Cinco cepas STEC analisadas apresentaram multiresistência a três classes diferentes de antimicrobianos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, I.P.S.; RODRIGUES, M.A.M. Qualidade Microbiológica de Queijo Tipo Mussarela Artesanal Comercializado em Uberlândia, MG. **Higiene Alimentar**, v.22, p. 101-105, 2008.

ALMEIDA FILHO, E. S; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. **Higiene Alimentar**; 16(102/103):71-73, 2002.

ANGULO, F.J., JOHNSON, K., TAUXE, R.V., COHEN, M.H. Significance and sources of antimicrobial – resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Microbiology Drug Research.**, v.6, p.77- 83, 2000.

ANSAY, S.E.; KASPAS, C. W. Survey of retail cheeses, dairing processing environments and raw Milk for *E.coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology** v.25, p.131-134, 1997.

ANTUNES, L. A F.; YABU, M.C.; SCHOLZ, M.B.S.; RAPACCI, M. Variações físico-químicas e sensoriais em misturas de leites bovino e bubalino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 43, n. 259. p. 20-22, 1998.

BARRET, ,T., KAPER, J.B., JERSE, A.E., WACHMUTH, I.K. Virulence factors in Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. **Journal of Infectious Diseases**, 165, 979-980, 1992

BETTELHEIM, K.A.; KUZEVSKI, R. A.; KRAUSE, D.O.;MCSWEENEY, C.S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.699-709, 2005.

BEUTIN, L.; GEIR, D;; STEINRUCK, H.; ZIMMERMAN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)- producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 2483-2488, 1993.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence markers of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.631-635,1995.

BEUTIN L, KRAUSE G, ZIMMERMANN S, KAULFUSS S, GLEIER K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology.**, 42:1099-1108, 2004.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia.** 24 ed. São Paulo, p.615- 619, 1985.

BIELASZEWSKA, M., SCHMIDT, H., KARMALI, M.A., KHAKHRIA, R., JANDA, J., BLAHOVA, K., KARCH, H. Isolation and characterization of sorbitol-fermenting shiga toxin (verocytotoxin) producing *E. coli* O157:H7- strains in Czech Republic. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 36, p. 2135-2137, 1998.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Research in Microbiology.**, v.148, p.745-755, 1997.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, ALLONSO, M.P.; GONZALEZ,E.A BERNARDEZ, M.I.; BLANCO,J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin) – producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae ϵ). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.645-51, 2004.

BOERLIN, P., McEWEN, S.A., BOERLIN-PETZOLDB, F., WILSON, J.B., JOHNSON, R.P., GYLES, C.I. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology.**, 37, 497-503, 1999.

BOOP, D.J., SAUDERS,B.D, WARING, A.L., ACKELSBERG, J., DUMAS, N., BRAUN-HOWLAND, E., DZIEWUSKI, D., WALLACE, B.J., KELLY., HALSE, T., MUSSER, K. A., SMITH, P.F., MORSE, D.L., LIMBERGER, R.J. Detection, isolation and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.1, p. 174-180, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela).

CAPRIOLI, A., BUSANI, L., MARTEL, J.L. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, v.14, p. 295- 301, 2000.

- CAPRIOLI, A., S. MORABITO, H. BRUGERE, AND E. OSWALD. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, p.289-311, 2005.
- CERGOLE-NOVELLA, M.C; NISHIMURA, L.S; IRINO, K; VAZ, T.M.I; CASTRO, A.F.P; LEOMIL, L. GUTH, B.E.C. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and food in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v.259, n.2, p.234-239, 2006.
- CHALMERS, R.M.; AIRD, H.; BOLTON, F.J. Waterborne *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 124-32, 2000.
- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 3462-3465, 1996.
- CHOPRA, I; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, n.2, p.232-260, 2001.
- COHEN, M.L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v.406, p. 762-767, 2000.
- CRAY JR, W.C. THOMAS, L.A., SCHNEIDER R.A., MOOM H.W. Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.369-374, 1996.
- DONNELLY, C. Approaches to ensuring the safety of raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, 87 (Suppl. 1) 122 (abstr), 2004.
- DRUBI, A. J; ÁVILA, F. Estudo bacteriológico de matérias primas de origem animal utilizadas na fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto-SP. **Higiene alimentar**, 21 (148): 97-103, 2007.
- ELDER, R.O.; KEEL, J.E. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.97, p.2999-3003, 2000.
- ELLIOT, S.J., et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 1-4, 1998.

FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003, 182p.

FRANKEL, G; PHILLIPS, A.D; ROSENSHINE, I; DOUGAN, G; KAPER, J.B, KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, p.911, 1998.

FURTADO, M.M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. 2ª ed. São Paulo: Editora Globo, 1991.

GERMANO et al. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene alimentar**, v.7, n. 27, 1993.

GRIFFIN, P.; M.; TAUXE, R. V. Illnesses associated with *E. Coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Review**, v. 13, p.60-98, 1991.

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

GYLES, C.; JOHNSON, R.; GAO, A.; ZIEBELL, K.; PIERARD, D.; ALEKSIC, S.; BOERLIN, P. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Hemolysin with serotypes of Shiga-Like-toxin-producing *Escherichia coli*. Of human and bovine origins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4134-4141, 1998.

GUYER, D.M.; GUNTHER, N.W.; MOBLEY, H.L.T. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. The **Journal of Infectious Diseases**, (Suppl 1), p.S32-35, 2001.

HACKER, J. HUGHES, C.; HOF, H.; GOEBEL, W. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. **Infection and Immunity**, v.42, n.1, p. 57-63, 1983.

HACKER, J.; KAPPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**,v.54, p.641-79,2000.

HONISH, L., PREDY, G., HISLOP, N., CHUI, L., KOWQLEWSKA-GROCHOWSKA, K., TROTIER., KREPLIN, C.,ZAZULAK, I. An outbreak of *E.coli* O157:H7 hemorrhagic colits associated with unspasteurized gouda cheese. Canadian American **Journal of Public Health**, 96, 182-184, 2005.

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**, 105, 29-36, 2005.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica**, 20 ed., p.99-129, 1998.

JENKINS, C; NEIL, P.T; CHEASTY, T; SHAW, D.J; FRANKEL, G. DOUGAN, G; GUNN, G.J; SMITH, H. R; PATON, A.W; PATON, J.C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 1775-1778, 2003.

JOHNSON, J.R; DELAVARI, P.O; O'BRYAN,T.T; SMITH, K.E; TATINI,S. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markers (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.2, p.38-49, n.1, 2005.

JOHNSON, J.R; MURRAY, A.C; GAJEWSKI, A; SULLIVAN, M; SNIPPES,P; KUSKOWSKI, M.A; SMITH, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, p. 2161-2168, n.7, 2003.

JOHNSON, J.R., RUSSO, T. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E.coli*". **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.139, n.3, p. 155-162, 2002.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1306-1314, 2001

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. **Lancet**, p.1299-1300, 1983.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. Infection by verocytotoxin producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p. 15-38, 1989.

KEENE, W.E., HEDBERG, K., HERRIOT, D.E., HANCOCK, D.D., McKAY, R.W., BARRET, T.J. FLEMING, D.W. A prolonged outbreak of *E. coli* O157:H7 infection caused by commercially distributed raw milk . The **Journal of Infectious Diseases**, v.176, p.815-818, 1997.

KEKISMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. The study group. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic of Microbiology and Infectious Disease.**, v.40, p. 151-156, 2001.

KRISHNAN, C.; FITZGERALD, V.A.; DAKIN, S.J.; BEHME, R.J. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colits and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.25, p.1043-1047, 1987.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JR.; V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico** . Texto e atlas colorido. 2º ed., São Paulo, Editora Panamericana,61-132, 1997.

-KONOWALCHUC, J.; SPEIRS, J.L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, 1997.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.107-17, 2000.

LAGAGGIO, V.R.A.; FLORES, M.L.; SEGABINAZI, S.D. Avaliação Microbiológica da superfície de Mãos dos Funcionários do Restaurante Universitário, universidade Federal de Santa Maria- RS. **Higiene Alimentar**, v. 16, n 100, p. 107-110, 2002.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing E.coli. **Journal of Applied Microbiology.**, v.88, p.729-745, 2000.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by Polymerase Chain Reaction. **Journal Clinical of Microbiology.**, v.30, n.5, p.1189-1193, 1992.

LEVY, S. B. The antibiotic Paradox. **How the misuse of antibiotics destroy their curative powers**. 2ª. Ed. Perseus Publisbring, Cambridge, MA 2002.

LIRA, W.M., MACEDO, C., MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal Applied Microbiology.** v.97, p.861-866, 2004.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D. **Guia de terapia antiinfecçiosa**, v. 1, p.11-44, 1998.

MACEDO, M.P.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, A. A; AMARAL, J.B. ; SOUZA, J.C ; RESENDE, F. D. ; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção do leite

de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(3), p. 1084-1088, 2001.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conservad among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.5, p. 1664-1668, 1995.

MAIDHOF, H., GUERRA, B., ABBAS, S., ELSHEIKHA, H.M., WHITTHAM, T.S; BEUTIN, L. A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *E.coli* O118:H16 is spread in cattle and human over different European countries. **Applied and Environmental Microbiology** 68, 5834-5842, 2002

MOON, H.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *E.coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v.41, p.1340-1351, 1983.

MORA, A., BLANCO, J.E., BLANCO, M., ALONSO, M.P., DHABI, G., ECHEITA, A., GONZALEZ, E.A., BERNARDEZ, M. I., BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology.**, 156, 793-806, 2005

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY. 2002. Performance Standards for Antimicrobial disk Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, second ed. M31-A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, (P.A), USA, 81pp.

NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; BORGES, G.T; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus aureus* no processamento de queijo mussarela: detecção e avaliação da provável origem das linhagens isoladas. **Higiene Alimentar**, v.18, p. 51-56, 2004.

O'BRIEN. A. D; LA VECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* like toxin produced by *E. coli* **Infection and immunity**, v.40, p.675-683, 1983.

OLIVEIRA, C.A.F; MORENO, J.F.G; MESTIERI, L; GERMAN, P.M.L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de Laticínios do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p.31-35, 1998.

- PANETO, B. R; SCHOCKEN-ITURINO, R.P; MACEDO, C; SANTO, E; MARIN, J.M. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; 59(2): 508-512, 2007.
- PATTON, J.P., NASH, D.B., ABRUTYN, E. Urinary tract infection: economic considerations. **Medical Clinical of North America.**, 75:495-513,1991
- PATON, J.C., PATON A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clinical Microbiology Review.**,11, 450-479, 1998
- PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia, conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: **Makron Books do Brasil**, v. 2, p.111-125, 1997.
- PHILLIPS, I.; CASEWELL,M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 53, p. 28-52, 2004.
- PRADEL, N., LIVRELLI, V., DE CHAMPS, C., PALCOUX, J.B REYNAUD, A., SCHEUTZ, F., SIROT, J., JOLY, B., FORESTIER, C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study in France. **Journal Clinical Microbiology.**, 38, 1023-1031, 2000.
- QUINTO, E. J.; CEPEDA, A. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.24 , p. 291-295, 1997.
- READ, S. C.; GYLES, C.L.; CLARKE, R.C.; LIOR, H.; MCEWEN, S. (1990). Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in southwestern Ontario. **Epidemiology and infections**, v.105, p.11-20, 1990.
- RIGOBELLO, E.C., STELLA, A. E., AVILA, F. A., MACEDO, C., MARIN, J. M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal Food Microbiology** 110, 194-198, 2006.
- RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGRESON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B.; HERBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colits associated with a rare *Escherichia coli* serotypes. **New England Journal of Medicine.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

- RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. The **Journal of Infectious Diseases.**, v.181, p.1753-1754, 2000.
- SANTO, E; RODOLPHO,D; MARIN,J.M. Presence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in butcheries in Taquaritinga, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v.38, n.4, p.591-593, 2007.
- SCOTLAND, S. M.; WILLSSHAW, G. A.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Properties of strains of *E. coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. The **Journal of Infectious Diseases.**, v. 162, p. 1069-1074, 1990.
- SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, p.885-6, 1985.
- SELANDER, R.K., AND B.R. LEWIN. Genetic diversity and structure in *E.coli* populations. **Science**, 210: 545-547, 1980.
- SMITH, J.L; FRATAMICO, P.M; GUNTER, N.M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease.**, v.4, n.2, p.134-163, 2007.
- SILVA, A.C.O.; LAMAITA, H.C.; HOTTA, J.M; VERAS, J.F; ALMEIDA, M.R; PENNA, C.F.A.M; CERQUEIRA, M.M.O.P; SOUZA,M.R. Pesquisa de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C em queijo mussarela. **Revista de Laticínios Candido Tostes**, v.327, n.57, p.301-304, 2002.
- SOLOMON, E.B.; YARON, S.; MATTHEWS, K.R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.397-400, 2002.
- SPANO, G., GOFFREDO, E., BENEDEUCE, L., TARANTINO, D., DUPUY, A., MASSA, S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. **Letters Applied Microbiology.**, 36, 423-427, 2003.
- STEPHAN, R., SCHUMACHER, S., CORTI, S., KRAUSE, G., DANUSER, J., BEUTIN, L., 2008. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swiss raw Milk cheeses Collected at Producer Level. **Journal Dairy Science.**, 91- 2561-2565, 2008.
- STEVENS, M.P.; van DIEMEN, P.M; DZIVA, F.; JONES, P.W., WALLIS, T.S. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, v.148, p.3767-3778, 2002

- STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.3, p. 1116-22, 1988.
- SWERDLOW, D.L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C.; GRIFFIN, P.M.; TIPPEN, S.; DONNELL, H.D.; GELDREICH, E.; PAYNE, B.J.; MEYER JR, A. A water-borne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, p.812-819, 1992.
- SUMMERS, A. O. Generally overlooked fundamentals of bacteria genetics and ecology. **Clinical Infectious Diseases**.,v. 34, p. S85- S92, 2002.
- TEIXEIRA, L.V., FONSECA, L. M., MENEZES, L. D. M., 2007. Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijos Minas padrão e mozzarella produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**., 59, 264-267.
- TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 493-499, 2001.
- TOLEDO, M.R. F.; ALVARIZA, M. C. R.; MURAHVSCHI, J.; RAMOS, S. R. T. S.; TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *E.coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**., v.39, p.586-589, 1983.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O. F.; CANDEIAS, J. A.N. **Microbiologia** 3ª. ed., ed. Atheneu, Rio de Janeiro, p. 586-589, 2002.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. **Journal Antimicrobial Chemotherapy** 53, 26-27, 2004.
- VALLE, J.L.E; CAMPOS, S.D.S; YOTSUYANAGI, K; SOUZA, G. Influência de parâmetros físico-químicos na fermentação e filagem do queijo Mozzarella. São Paulo, 1991, 88p. Tese de Doutorado, USP/FCF.
- Van den BOGAARD, A.E., STOBBEING, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Link between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**., v. 14, p.327-325, 2000.
- VERNOZY-ROZAND, C.,MONTET, M. P., BERADIN, M. BAVAL, C., BEUTIN, L. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. **Letters Applied Microbiology**., 41: 235-241, 2005.
- WASK, C., DUFFY, G., O'MAHONY, R., FANNING, S., BLAIR, I. S., MCDOWELL, D. A., 2006. Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxigenic

Escherichia coli (*E. coli*)-VTEC. **International Journal of Food Microbiology.**, 109, 173-178, 2006.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.7, p.2567-2570, 1996.

WANG, G.; DOYLE, M.P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Journal of Food Protection**, v.61, p.662-667, 1998.

WHITE, D. G., McDERMOTT, P.F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal Dairy Science**. 84 (E. Suppl.), E151-E155, 2001.

WHITE, D.G.; ZAHO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.; McDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, v.4, p.405-12, 2002.

WHO. **Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections**. Geneva: WHO, 1997.

WILSON, J.B.; CLARKE, R.C.; RENWICK, S.A.; RAHN, K.; JOHNSON, R.P.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; ALVES, D.; GYLES, C.L.; SANDHU, K. S.; McEWEN, S.A.; SPIKA, J.S. Vero cytotoxigenic *E. coli* infection in dairy farm families. **Journal of Infectious Diseases.**, v.174, p. 1021-1027, 1996.

YOUMANS, G.P.; PATERSON, P.Y.; SOMMERS, H.M. Bases biológicas e clínicas das doenças infecciosas. 2. ed, p.809-879, 1983.

YOUNG, H.K. Do nonclinical uses of antibiotics make a difference? **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.15, p. 484-7, 1994.

ZAFFARI, C.B; MELLO, J.F; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, p. 862- 867, 2007.

ZHAO, S.; WHITE, D. G.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, I.; WAGNER, D.; GAINES, S.; MENG, H. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 67, p. 1558-1564, 2001.