



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DEBORA HELENA LEME DE CARVALHO VITORINO

**AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICAS
ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE BOVINOS DE UM
FRIGORÍFICO DA REGIÃO DE LONDRINA-PR**

Londrina
2018

DEBORA HELENA LEME DE CARVALHO VITORINO

**AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICAS
ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE BOVINOS DE UM
FRIGORÍFICO DA REGIÃO DE LONDRINA-PR**

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado Profissional em Clínicas
Veterinárias da Universidade Estadual
de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2018

DEBORA HELENA LEME DE CARVALHO VITORINO

**AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICAS
ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE BOVINOS DE UM FRIGORÍFICO DA
REGIÃO DE LONDRINA-PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr.Gerson Nakazato

BANCA EXAMINADORA

Orientador:
Prof. Dr.Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a.Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr.Wilmar Sachetin Marçal
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de Agosto de 2018.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e me incentivaram durante a evolução deste trabalho. Ao meu orientador e aos professores que com toda paciência conduziam as orientações mais importantes dessa pesquisa e compartilharam seus conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai de infinito amor e bondade, por toda a luz e amparo dedicados a mim em todos os momentos da minha vida, e pela oportunidade que me concedeu de me tornar uma profissional da educação.

À minha família, pelo amor, apoio e incentivo para que eu pudesse continuar meus estudos.

A meu orientador, Gerson Nakazato, não só pela paciência e dedicação em suas orientações, mas, sobretudo, pelo incentivo à busca incessante pelo conhecimento.

A todos os professores que fizeram parte dessa minha trajetória, contribuindo, significativamente, para minha aprendizagem.

Ensinar não é uma função vital, porque
não tem fim em si mesmo ,à função vital
é aprender.

Aristóteles

VITORINO, Debora Helena L. Carvalho. **Amostras de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas de carcaças de bovinos de um frigorífico da região de Londrina-PR.** 2018. 28 f. Dissertação (Mestrado em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A contaminação de alimentos por bactérias patogênicas é uma preocupação mundial para a saúde pública. Cepas de *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) oriundas de carnes bovinas tem causado surtos de infecção em diversas partes do mundo, principalmente as produtoras de toxinas, como a Shiga. Assim, o objetivo deste estudo foi observar aspectos microbiológicos de DEC, assim como padronizar a técnica de coleta e isolamento de DEC, em carcaças de bovinos, em um frigorífico da região de Londrina-PR. As amostras foram coletadas com “swab” de 90 carcaças bovinas, sendo 57 na linha de abate após evisceração, e 33 na linha de abate após o processo de lavagem. Para isolamento foi utilizado o meio MacConkey. A identificação de *E. coli* foi realizada por meio de série bioquímica, e os patótipos de DEC foram determinados pela reação em cadeia da polimerase. Do total de 57 carcaças, 46 (80,7%) apresentaram crescimento bacteriano antes da lavagem, sendo 37 (64,9%) positivas para *E. coli*., sendo 4 (12,12%) positivas para *E. coli* diarreio gênicas. Do total de 33 carcaças após a lavagem, 12 (36,3%) apresentaram crescimento, sendo 8 (24,2%) positivas para *E. coli*, 2 (6,06%) positivas para *E. coli* diarreio gênicas. Dentre os isolados de *E. coli* foram encontrados os patótipos de DEC, com *E. coli* (EPEC) enteropatogênica e *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC). Após o processo de lavagem das carcaças apenas dois isolados foram identificados como STEC. Estes resultados mostraram que o processo de lavagem reduziu a carga bacteriana, incluindo de *E. coli*, porém, cepas de STEC ainda foram encontrados após o processo, mostrando a importância do monitoramento microbiológico e o estudo epidemiológico em carcaças bovinas.

Palavras-chaves: Isolamento bacteriano, PCR, EPEC, STEC, genes de virulência.

VITORINO, Debora Helena L. Carvalho. ***Escherichia coli* isolated from carcasses of cattle from a fridge in the region of Londrina-PR.** 2018. 28 f. Dissertation (Masters in Veterinary Clinics) - Londrina State University, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Contamination of food by pathogenic bacteria is a worldwide concern for public health. *Escherichia coli* (DEC) strains from bovine meat have caused outbreaks of infection in several parts of the world, especially those which produce toxins such as Shiga. Thus, the aim of this study was to observe microbiological aspects of DEC, as well as to standardize the technique for collecting and isolating DEC in bovine carcasses in a fridge in the region of Londrina-PR. The samples were collected with swabs of 90 bovine carcasses, 57 in the slaughter line after evisceration and 33 in the slaughter line after the washing process. MacConkey was used for DEC isolation. Identification of *E. coli* as performed using biochemical series and DEC pathology was determined by the polymerase chain reaction. From the total of 57 carcasses, 46 (80.7%) presented bacterial growth before washing, 37 (64.9%) positive for *E. coli*, Path 4 (12.12%) positive for *E. coli* diarrheagenic. From the total of 33 carcasses after washing, 12 (36.3%) presented growth, 8 (24.2%) positive for *E. coli*. And 2 (6.06%) positive for *E. coli* diarrheagenic. Among the *E. coli* isolated were found DEC pathology, as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-producing *E. coli* (STEC). Following the carcass washing process, only two isolated were identified as STEC. These results showed that the washing process reduced the bacterial load, including *E. coli*. However, STEC strains were still found after analysing the whole process, showing the importance of microbiological monitoring and the epidemiological study in bovine carcasses

Keywords: Bacterial isolation, PCR, EPEC, STEC, virulence genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Colheita de amostra para exame com <i>swab</i> .	14
Figura 2 - Placas macconkey com crescimento bacteriano	15
Figura 3 - Isolamento bacteriano em meio macconkey da amostra 24 (carcaça bovina antes do processo de lavagem).	17
Figura 4 - Detecção de genes de virulência de <i>ec</i> pela técnica de reação em cadeia da polimerase de isolados de <i>E. coli</i> de carcaças bovinas antes do processo de lavagem. C: controle sem DNA; C+: controle positivo (<i>E. coli</i> O157:H7); C-: controle negativo (<i>E. coli</i> K12 – dh5 α); 15b a 49: isolados de <i>E. coli</i> (antes do processo de lavagem).....	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Isolados de *E. Coli* do estudo contendo genes de virulência de dec antes e depois do processo de lavagem. 18

4 LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UEL	Universidade Estadual de Londrina
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	COLHEITA	13
2.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. COLI</i>	15
2.3	DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA POR REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	15
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3	RESULTADOS	17
3.1	ISOLAMENTO	17
3.2	PERFIL DE VIRULÊNCIA, GRUPOS EAE E STX	18
4	DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25

INTRODUÇÃO

No século XIX pouco se sabia sobre os tipos de microrganismos que causavam diarreia, e o que se observava, era que parasitos intestinais causavam infecções frequentes, e eram responsáveis por muitos problemas para a saúde pública.

E. coli é uma bactéria conhecida por sua grande diversidade patogênica, as cepas responsáveis por causar infecção intestinal estão classificadas ao menos em cinco categorias (patotipos), sendo que cada uma possui diferentes fatores de virulência e sintomas: *E.coli* enteropatogênica (EPEC), produtora de toxina Shiga (STEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC) e enteroinvasora (EIEC) (MARTINEZ & TRABULSI, 2008). Dentro do grupo de STEC, cepas que contém, além da toxina Shiga, o gene *eae* (gene de EPEC), são definidas como enterohemorrágicas (EHEC), que estão associadas a doenças mais graves, como a Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH).

Infecções causadas por cepas de STEC e EHEC estão entre as mais relatadas mundialmente, sendo que entre as cepas de EHEC, o sorotipo O157:H7 foi inicialmente associado com SUH e colite hemorrágica, no início dos anos 80, causando sérios surtos em diversos países como Estados Unidos, Japão e Argentina (W.H.O., 1998).

Os Estados Unidos tiveram o maior surto de infecção de *E.coli* por STEC onde foram acometidos, pela ingestão de hambúrguer contaminado, 700 pessoas em quatro estados, sendo a maioria delas formada por jovens, quatro pessoas morreram.

O principal reservatório de STEC é o gado bovino, geralmente saudável, apesar destas cepas também terem sido isoladas de outros animais domésticos como cães, gatos, ovelhas, cabras e suínos (BERTÃO et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivo detectar DEC em carcaças bovina, através de um método de detecção molecular, que podem contribuir para futuros estudos epidemiológicos no controle das infecções bacterianas.

7

MATERIAL E MÉTODOS

7.1 COLHEITA

Para a colheita das amostras enfrentamos dificuldades de conseguir autorizações para entrada nos frigoríficos devido a Operação Carne Fraca da Polícia Federal essa operação foi um acontecimento que expôs ao país algumas empresas do ramo alimentício que estavam sendo acusadas de adulterar produtos alimentícios. Autoridades alertaram para a imagem que o escândalo poderia causar na indústria nacional e seus possíveis impactos na economia, todo isso acontecia na época da colheita das amostras.

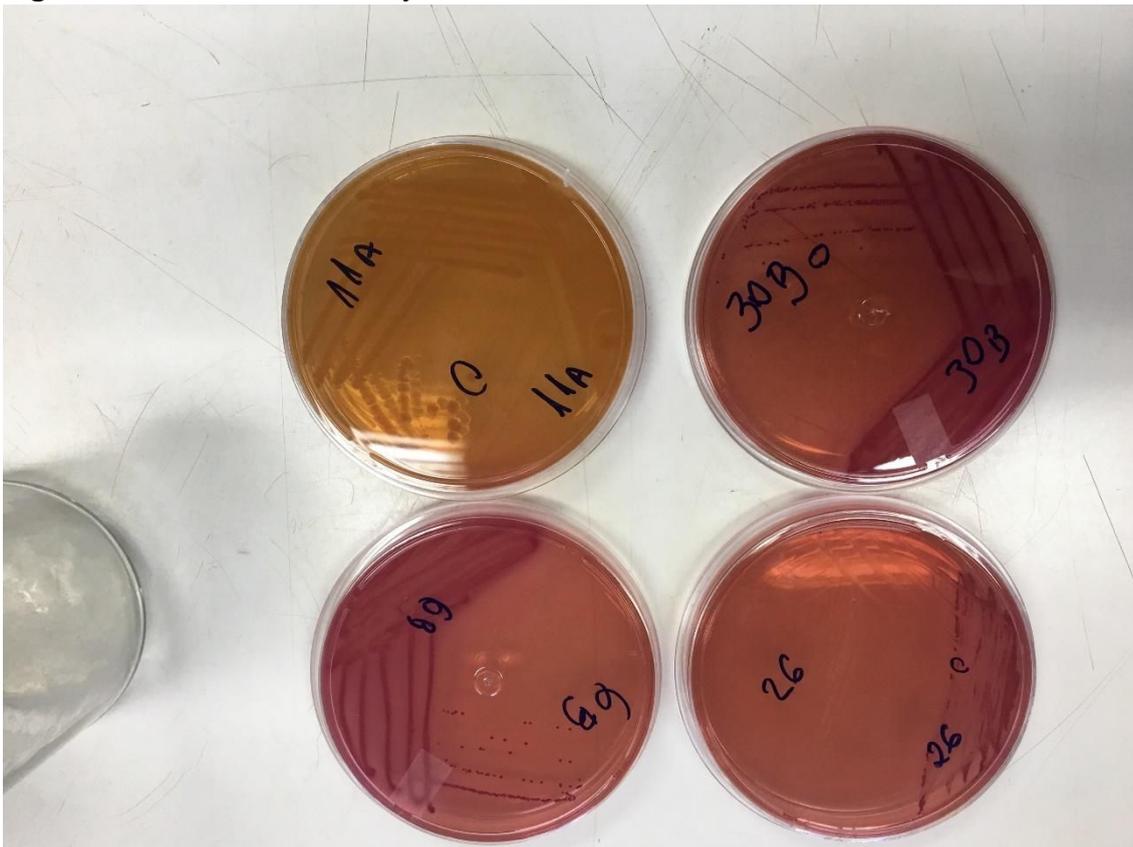
As amostras bacterianas foram isoladas de carcaças bovinas, antes da lavagem (57 carcaças) e após a lavagem (33 carcaças), as carcaças eram de animais oriundos de cruzamento industrial, machos e fêmeas, com 18 meses de idade e pesando entre 17 e 18 (arrobas), abatidas em frigorífico com inspeção Estadual na região de Jaguapitã, no período de abril e maio de 2018. O sistema de produção destes animais é de semi-confinamento, e o produto final é comercializado em açougues da região de Londrina, Paraná, Brasil. O material para posterior cultura bacteriológica foi colhido pelo uso de um “swab” esterilizado na musculatura sacrocaudal da região da inserção caudal, num perímetro de 10 X 10 cm no sentido posterior caudal. As colheitas foram realizadas nas seguintes condições: 1) Antes da lavagem das carcaças; 2) Após a lavagem das carcaças, a uma pressão de 3atm e cloração da água entre 0,8 e 10 ppm. Após a lavagem os “swabs” foram acondicionados em tubos de ensaios contendo o meio de manutenção BHI, e levados imediatamente para o Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, para posterior isolamento e identificação de *E. coli*.

Figura1: Colheita de amostra para exame com *swab*.



Fonte: A própria autora.

Figura 2: Placas MacConkey com crescimento bacteriano



Fonte: A própria autora.

7.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. COLI*

As amostras foram semeadas em placas de ágar MacConkey (Difco, USA) e crescidas em uma estufa bacteriológica, durante 18-24 horas, a uma temperatura de 37°C. Após crescimento, uma a duas colônias típicas de *E. coli* foram re-isoladas, para posterior identificação bioquímica utilizando os meios EPM, MILi e Citrato.

7.3 DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA POR REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A presença de genes de virulência foi verificada usando três sistemas de

MultiplexPCR(Puño-Sarmiento et al., 2014). Os seguintes marcadores (genes) de virulência foram utilizados para detectar DEC: *eaeA* (gene estrutural que codifica a adesina intimina em EPEC e EHEC), *bfpA* (gene estrutural para o bundleforming-pilus de EPEC típica), *aggR* (ativador transcricional de EAEC típica), *elt e est*(enterotoxinas de ETEC), *ipaH* (gene que codifica invasina pelo plasmídeo de invasão, encontrado em EIEC), *stx1*, *stx2* (toxinas Shiga de STEC), e *ehxA* (enterohemolisina, que pode ser encontrado na EHEC e EPEC).

7.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para esse estudo realizou-se análise estatística descritiva, calculando-se as frequências absolutas e relativas (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

8.1 ISOLAMENTO

Do total de 57 carcaças, 46 (80,7%) apresentaram crescimento bacteriano antes da lavagem, sendo 37 (64,9%) positivas para *E. coli.*, sendo 4(12,12%) positivas para *E.coli* diarreio gênica. Do total de 33 carcaças após a lavagem, 12 (36,3%) apresentaram crescimento, sendo 8 (24,2%) positivas para *E. coli*. 2 (6,06%) positivas para *E.coli* diarreio gênica. Diferentes aspectos (cor, tamanho, mucoide) de colônias observados foram no meio MacConkey (figura 2), assim como diferentes quantidades de colônias foram observadas em diferentes carcaças (dados não mostrados).

Figura 3- Isolamento bacteriano em meio MacConkey da amostra 24 (carcaça bovina antes do processo de lavagem).



Fonte: A própria autora.

8.2 PERFIL DE VIRULÊNCIA, GRUPOS EAE E STX

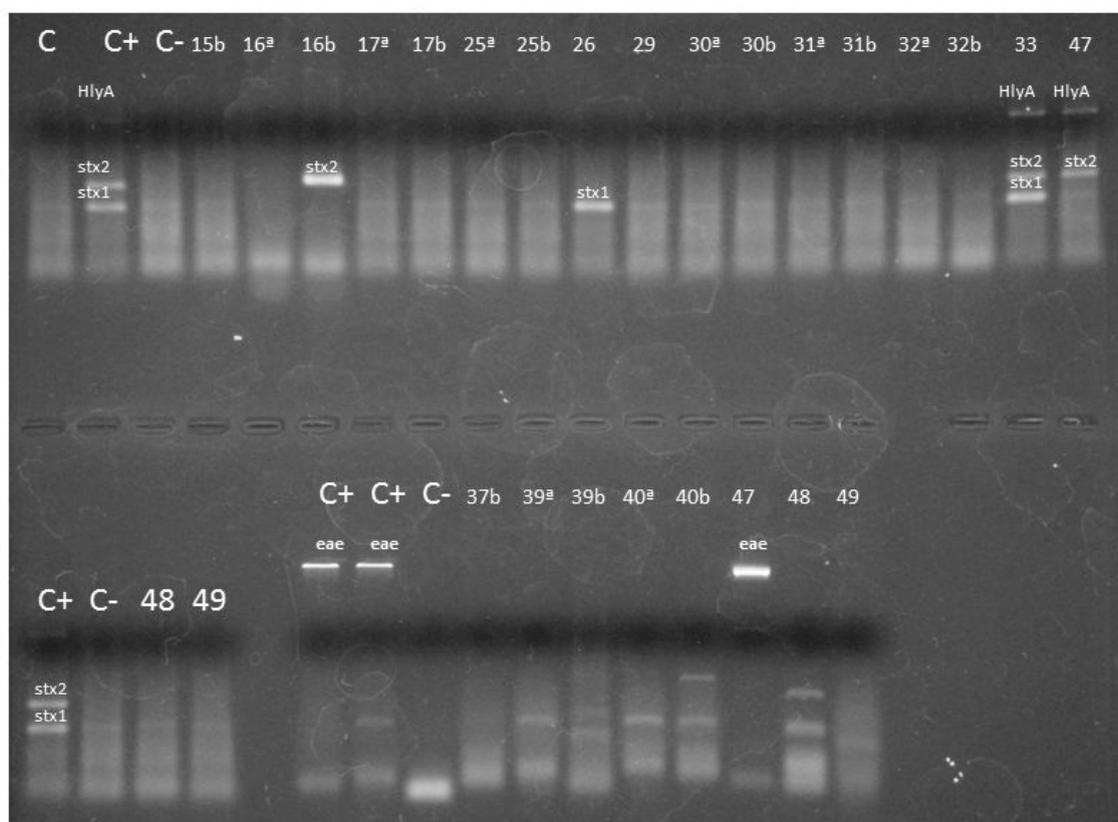
Do total de 57 isolados de *E. coli* das carcaças antes do processo de lavagem, foram identificadas quatro cepas de DEC (tabela), e dos 12 isolados de *E. coli*, apenas 2 cepas de STEC foram detectados (tabela). Um isolado de EHEC (genes *eae* e *Stx2*) foi detectado em uma carcaça antes do processo de lavagem pela técnica da reação em cadeia da polimerase (figura 5).

Tabela 1- Isolados de *E. coli* do estudo contendo genes de virulência de DEC antes e depois do processo de lavagem.

Lavagem	Isolados de <i>E. coli</i>	Genes	Patotipo de DEC
ANTES	16	<i>Stx2</i>	STEC
ANTES	26	<i>Stx1</i>	STEC
ANTES	33	<i>hlyA,Stx1,Stx2</i>	STEC
ANTES	47	<i>hlyA,eae,Stx2</i>	EHEC
APÓS	26b	<i>Stx1</i>	STEC
APÓS	30	<i>Stx1</i>	STEC

Fonte: A própria autora.

Figura 4- Detecção de genes de virulência de DEC pela técnica de reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* de carcaças bovinas antes do processo de lavagem. C: Controle sem DNA; C+: Controle positivo (*E. coli* O157:H7); C-: Controle negativo (*E. coli* K12 – DH5 α); 15b a 49: Isolados de *E. coli* (antes do processo de lavagem).



Fonte: A própria autora.

DISCUSSÃO

A maior parte da microbiota da carne *in natura* encontra-se em sua superfície, e a pele e conteúdos da evisceração, são consideradas as principais fontes de origem da maioria das contaminações microbiológicas de carcaças animais (Gill et al., 2009), onde as bactérias são depositadas na parte externa da carne, durante as operações de abate e pós-abate.

Por ocasião do abate, a carne pode ser contaminada após contato com pelos, pele, conteúdo gastrointestinal, equipamentos, utensílios, mãos e vestuário dos operadores, e a água utilizada para lavagem das carcaças (Stella et al., 2009). Em virtude disso, a região da carcaça para a colheita foi selecionada pelo fato da sua proximidade com vísceras intestinais, fonte principal para aparecimento de *E. coli* e a maior manipulação pelos operadores facilitando a contaminação do local escolhido para a colheita de material. Os resultados do isolamento de *E. coli*, incluindo as potencialmente patogênicas como amostras de DEC, comprovaram a contaminação bacteriana por enterobactérias com potencial patogênico (tabela 1). O processo de coleta e transporte mostrou ser adequado para o isolamento de enterobactérias de carcaças principalmente para *E. coli*, uma vez que foi verificado o crescimento bacteriano em quase todas as placas antes do processo de lavagem das carcaças. Para o isolamento bacteriano, não foi necessário pré-enriquecimento e nem diluição do material, porém por causa da diversidade de colônias isoladas, houve uma certa dificuldade na seleção de colônias suspeitas principalmente para as placas da pós-lavagem, provavelmente diminuição de colônias típicas de *E. coli*. Gill et al. (2009) verificaram que operações de lavagem de carcaças, desde que ajustadas, podem remover quantidades substanciais de microrganismos como *E. coli* e outros patógenos, que inevitavelmente possam ser depositados nas carcaças durante o processo de esfola. Conseguimos observar isso através das análises dos resultados das coletas onde, 12,06% das amostras coletadas antes da lavagem estavam contaminadas e apenas 6,06% das amostras das coletas deram positivos após a lavagem. O processo de lavagem mostrou ser eficiente para a redução da carga bacteriana que cresce em meio MacConkey (enterobactérias), entretanto os resultados do crescimento de poucas colônias bacterianas após a lavagem ainda

apresentaram amostras de *E. coli* contendo genes de toxinas (toxina Shiga). A toxina Shiga identificada nessas amostras poderiam causar diarreia, colite hemorrágica ou até Síndrome Urêmica Hemolítica em humanos, uma vez que os bovinos são reservatórios naturais desse patotipo de DEC.

Os resultados obtidos antes da lavagem de 64,9% de crescimento de *E. coli* e destes 12,12% de *E. coli* encontrado com potencial patogênico foram considerados altos visto o potencial destas bactérias de causar inúmeros danos a saúde, esse resultado foi maior encontrado por Bohaychuk et al. 2011, foi de 10.6% das amostras obtidas de carcaça bovina provenientes de abatedouros inspecionados em Alberta, no Canadá.

A lavagem das carcas com água clorada mostrou-se eficiente pois houve diminuição para 6,06% das amostras encontradas com de *E. coli* encontrado com potencial patogênico, mesmo assim é um ponto crítico a ser analisado e melhorado, pois após esse processo, a carne irá diretamente para o consumo humano. Os resultados obtidos após a lavagem foram superiores ao encontrado por Casagrande et al. (2013), onde a ocorrência da *E. coli* limitou-se a 4,4% das amostras analisadas a partir de carcaças bovinas.

Diversos fatores podem estar associados ao grau de isolamento bacteriano em carcaças bovinas, como os processos de esfola e manipulação das carcaças. Além disso, o nosso grupo de pesquisa aplica um processo de isolamento bacteriano adaptado e voltado para cepas de *E. coli*, e que pode variar em alguns aspectos importantes como região da carcaça escolhida para a colheita e meios de culturas utilizados.

Para a determinação dos principais patótipos de DEC, escolhemos a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), pois além da eficiência do método molecular (detecta genes ou marcadores genéticos), nosso grupo de pesquisa vem padronizando e utilizando a PCR para vários genes, inclusive para conjunto de genes na mesma reação (*Multiplex-PCR*), principalmente para *E. coli*. A PCR é rápida (poucas horas de ensaio) e altamente sensível e específico para detecção (diagnóstico). No nosso caso, os ensaios de PCR foram realizados em apenas dois dias para isolados antes e também pós-lavagem, totalizando quatro dias para todo o processo de PCR. Já o processo de colheita, isolamento e identificação

bacteriana perduraram muito mais tempo (aproximadamente uma semana para cada processo: antes e pós-lavagem).

Os genes de virulência encontrados por meio da técnica de PCR sugerem um alerta para que os processos de manipulação no frigorífico possam ser melhorados, pois mesmo após lavagem com água clorada, foram encontradas cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga. Essa toxina é considerada uma das toxinas mais potentes em termos de virulência bacteriana, sendo essa descrita na lista de potenciais “armas biológicas” junto com outras toxinas, como a botulínica e antrax. Recentemente, essa toxina causou um surto na Europa (Alemanha) em 2011, causando alta taxa de mortalidade por causa da Síndrome Urêmica Hemolítica (SHU). (Klaus Verbeck, 2011).

Em nosso estudo, encontramos apenas um isolado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), antes do processo de lavagem. As cepas de EHEC têm provocado doenças em países, e estima-se que 73 mil infecções e 60 mortes por ano nos EUA sejam causadas por estas cepas. Apresenta alta incidência em crianças menores de 5 anos de idade e ocorre mais frequentemente nos meses mais quentes do ano, podendo a ingestão de menos de 100 bactérias causar a doença. A maioria destas infecções está relacionada ao consumo de carne moída mal cozida ou de outros produtos derivados da carne, água, leite cru, vegetais mal cozidos e frutas (MURRAY et al., 2009). Apesar do isolamento de apenas uma cepa de EHEC, tal fato serve de alerta, pois a finalidade inicial do estudo era metodológica (com poucas amostras e apenas um frigorífico), e o resultado mostrou a importância de se fazer um monitoramento mais aprofundado da qualidade bacteriológica.

Os tipos de toxina Shiga (Stx1 e Stx2) são importantes, pois epidemiologicamente podem fornecer informações úteis para o potencial patogênico e origem da contaminação. A toxina Shiga do tipo 1 (Stx1) está mais relacionada a colite hemorrágica em humanos, enquanto a do tipo 2 (Stx2) está associada a SHU em humanos, e em reservatório em diferentes espécies animais (suínos, bovinos, ovinos, caninos e felinos). No nosso estudo foram isolados os dois tipos de toxinas, inclusive em mesmas cepas, 2 toxinas, mostrando o potencial patogênico para humanos. Para um estudo mais completo para verificar mais profundamente o potencial patogênico para os humanos (saúde pública), a sorotipagem desses

isolados de *E. coli* e a subtipagem da Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c..) seriam interessantes pois confrontariam com o perfil de STEC descritas em diferentes surtos no mundo todo.

Assim, nossos resultados mostraram a importância de pesquisar mais profundamente determinados patótipos bacterianos, no nosso caso foi de DEC, usando metodologias específicas e eficazes, podendo integrar os estudos para melhor acompanhamento dos métodos e processos para a diminuição e possível contaminação humana e animal.

10

CONCLUSÃO

Embora a incidência de infecção em humanos por STEC seja relativamente baixa no Brasil, a presença de STEC e EHEC em carcaças bovinas, justificam a sua continuidade sistemática pela técnica molecular que se mostrou eficiente neste trabalho, a fim de minimizaras contaminações

REFERÊNCIAS

- ÁLVARES, P. P. **Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da Grande São Paulo.** 2011. 100 f. Dissertação de mestrado em Ciência do Alimento (Pós-Graduação em Ciência do Alimento) - São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
- BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.28, n.2, p.81-92, 2007.
- BESSER, T.E. et al. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: Infectious dose and direct contact transmission. **Epidemiology and Infection**, v. 127, n. 3, p. 555–560, 2001.
- BEUTIN, L. et al. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiol**, v. 27, n. 1, p. 2559-2564, 1989.
- BEUTIN, L. et al. 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.
- BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; BARRIOS, P. R. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 10, p. 1095- 1100, out. 2011.
- CALDORIN, M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. BEPA, **Bol. epidemiol. Paul.** (Online), São Paulo, v.10, n.110, fev. 2013. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180642722013000200001&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 19 mai. 2017.
- CARVALHO, A. F. et al. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 4, p.881-6, 2012.
- CASAGRANDE, L.; DETANICO, C. M. T.; FRANCO, R. M. Ocorrência de *Escherichia coli* em meias carcaças de bovinos abatidos em estabelecimento habilitado para exportação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.6, p.1025- 1030, jun. 2013.
- COURA, F. M. et al. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.34, n.9, p.811-818, Set. 2014. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2014000900001&lng=en&nrm=iso Acesso em: 08 mai. 2017.

ELMOSLEMANY, A. M. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on- farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 95, p.32-40, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381889>. Acesso em: 12 mai 2017.

FARROK, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 162, p. 190-212, 2013.

FEDORKA-CRAY, P. J. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella Typhimurium* in swine. **Infection and Immunity**, v.63, n.7, p.2658-2664, 1995. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/reprint/63/7/2658>. Acesso em: 11 mai. 2017.

FERNANDEZ, D.; PADOLA, N. L. *Escherichia coli* verocitotoxigénico: varias cuestiones... y lostambostambién. **Rev Argent. microbiol.**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 44, n.4, p. 312-323, dez. 2012. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032575412012000400013&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 05 mai. 2018.

GILL, A. et al. The determinants of capital structure in the service industry: evidence from United States. **Open Bus. J.**, v. 2, p. 48-53, 2009.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic. Reviews**, Baltimore, v.13, n.1, p.60-98, Jan. 1993.

GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciências agro técnicas**, v.29, n.1, p.216-222, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542005000100027.A Acesso em: 05 mai. 2017.

GUTH, B. E. C. et al. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in São Paulo, **Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online], v. 97, n. 8, p. 1085-1089, Dez. 2002.

HAUGE, S. J. et al. Evaluation of the SimPlate method for enumeration of *Escherichia coli* in swab samples from beef and lamb carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p. 229-233, abr.-jun. 2010.

LIMA, P. G. et al. Viabilidade de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) produtoras de toxina Shiga em queijo minas frescal. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, p.52-57, Jan. 2015. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782015000100052&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 08 mai. 2017.

MARQUES, P. **Avaliação de metodologias para isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 produtora de verotoxina em hambúrgueres**. 2011, 87 f. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

MARTINEZ, M. B; TRABULSI, L. R. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, LR; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. Ed. Atheneu, 2008. Cap. 35, p. 271- 279.

MATSUBARA, M. T. et al. Boas práticas de ordenha para a redução de contaminação microbiológicas do leite no agreste Pernambuco. **Ciência Agrárias**, v.32, n.1, p.277-286, Londrina, Paraná. 2011. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/3283/7138>. Acesso em: 15 mai. 2017.

MURRAY, P. R.; ROSENTH, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 6 ed. Rio de Janeiro.1998.

NATARRO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. **Microbiol. Rev.** v.11, p. 142–20, 1998.

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

SAMPAIO, S. M. R. **Observatório da vida estudantil: histórias de vida e formação na educação superior**. Salvador: EDUFBA, 2011.

SCHAFFIN, J. K. et al. Public health approach to detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: summary of two outbreaks and laboratory procedures. **Epidemiol. Infect.**, v. 140, p. 283–289, 2012.

STTELA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil**. 2009, 85 f. Tese de doutorado em Microbiologia Agropecuária (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) -Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2009.

WHO, A. Manual for the Treatment of Acute Diarrhoea. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiol. Rev.** v. 11, p. 142-201, 1984.

