

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/40316

IB/81474

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ARLETE DUARTE

ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC) E "Shiga-toxin-producing" *Escherichia*
coli (STEC) EM PRODUTOS DE LATICÍNIOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Arlete Duarte
e aprovada pela Comissão Julgadora
09/12/99 *DS Leite*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a
obtenção de título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular, área de concentração
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

1999

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	D 85e
V.	Ex.
TOMBO	BC/40316
PROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> K
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/03/00
N.º CPD	

CM-00131904-1

IB 000224250

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Duarte, Arlete

D85e Estudo da ocorrência de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e “Shiga-toxin-producing” *Escherichia coli* (STEC) em produtos de laticínios/ Arlete Duarte. -- Campinas, SP: [s.n.] 1999.
67 f. ilus.


Orientador: Domingos da Silva Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Laticínios. 3. Virulência (Microbiologia).
4. Patogenicidade. I. Leite, Domingos da Silva. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 09/12/1999

Banca Examinadora

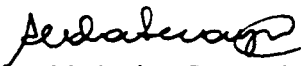
Titulares:



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite (Orientador)



Prof. Dr. Tomomasa Yano



Profa. Dra. Alda Luiza Santos Lerayer

Suplente:

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

em memória do meu pai Francisco

AGRADECIMENTOS

À Deus que permitiu e me deu forças para que esse trabalho fosse realizado.

À minha mãe Maria José e ao meu namorado João Bosco, pelo carinho, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por sua prontidão e pela forma como conduziu o trabalho.

À Profa Ana Lourdes Neves Gândara, do Laboratório Apoio - Microbiológico, do Departamento Tecnologia, da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), pela sua contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelos serviços prestados.

Aos membros da banca examinadora, pela correção e enriquecimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo nº 97/03590-9) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	2
1.1.1. Epidemiologia da doença causada por ETEC.....	4
1.2. “Shiga -toxin-producing” <i>Escherichia coli</i> (STEC).....	5
1.2.1. Epidemiologia da doença causada por STEC.....	8
1.3. Características Bioquímicas e de Crescimento.....	10
1.4. <i>Escherichia coli</i> em alimentos.....	13
1.4.1 <i>Escherichia coli</i> em Produtos Lácteos.....	16
1.4.1.1 Leite Cru.....	16
1.4.1.2. Leite Pasteurizado e UHT.....	17
1.4.1.3 Queijo.....	19
1.4.1.4 Manteiga.....	20
II - OBJETIVOS.....	21
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Amostras de <i>E. coli</i>	22
3.1.1. Padrões.....	22
3.1.2. Produtos Lácteos.....	22
3.1.2.1. Leite.....	22
3.1.2.2. Manteiga.....	23
3.1.2.3. Queijo.....	23
3.2. Análise Microbiológica.....	23
3.3. Isolamento e Identificação.....	24
3.4. Reação de Polimerase em Cadeia.....	25
3.4.1. Extração de DNA total das amostras de <i>E. coli</i>	25
3.4.2. Protocolos de Amplificação.....	26

IV - RESULTADOS.....	29
4.1. Leite Pasteurizado.....	29
4.2. Manteiga.....	32
4.3. Queijo.....	35
V - DISCUSSÃO.....	39
VI - CONCLUSÕES.....	45
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01. Resultados obtidos no isolamento de <i>E. coli</i> de leite pasteurizado e na detecção das toxinas ST-I, LT-I, Stx1 e Stx2	30
Tabela 02. Resultados obtidos no isolamento de <i>E. coli</i> de manteiga e na detecção das toxinas ST-I, LT-I, Stx1 e Stx2.....	33
Tabela 03. Resultados obtidos no isolamento de <i>E. coli</i> de queijo e na detecção das toxinas ST-I, LT-I, Stx1 e Stx2.....	36

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01. Número de amostras de leite pasteurizado analisadas e número de amostras positivas para <i>E. coli</i>	31
Gráfico 02. Número de amostras de manteiga analisadas e número de amostras positivas para <i>E. coli</i>	34
Gráfico 03. Número de amostras de queijo analisadas e número de amostras positivas para <i>E. coli</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Perfil eletroforético dos produtos da reação de amplificação (PCR).....	38
--	----

RESUMO

Escherichia coli faz parte dos coliformes fecais, como também os microrganismos dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* e é internacionalmente considerado indicador de segurança microbiológica. A presença desse microrganismo nos alimentos demonstra que as práticas-higiênica-sanitárias foram inadequadas.

O objetivo desse trabalho foi pesquisar a presença de dois subgrupos de *E. coli*: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e “Shiga- toxin- producing” *E. coli* (STEC) em produtos de laticínios.

Os produtos de laticínios analisados foram leite pasteurizado, manteiga e queijo coletados na região de Campinas.

Foram pesquisadas 105 amostras de leite pasteurizado: 35 amostras de leite pasteurizado tipo A; 35 amostras de leite pasteurizado tipo B e 35 amostras de leite pasteurizado tipo C. Das 105 amostras de leite, 33 (31,4%) estavam contaminadas com *E. coli*. Foram analisadas 81 amostras de manteiga das quais 5 amostras (6,2%) foram positivas para *E. coli*. Das 81 amostras de queijo analisadas (25%) apresentaram a presença de *E. coli*.

A presença desse microrganismo em alimentos lácteos pode ser devido a uma pasteurização inadequada ou a contaminação após a pasteurização. Os resultados obtidos demonstram que, apesar da legislação e da fiscalização, os produtos de laticínio necessitam de práticas sanitárias mais eficientes para eliminar as possíveis fontes de contaminação que possam colocar em risco a saúde do consumidor.

I - INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, não-esporulado, anaeróbio facultativo, as temperaturas ótimas para o seu crescimento são de 35° C a 37° C, podendo crescer em temperatura ambiente até 45° C e em pH entre 4,4 a 9,0, geralmente móvel com flagelos peritríquicos, na maioria das vezes, fimbrias e cápsula são encontradas em algumas amostras (REED, 1994; SUSSMAN, 1997).

A maioria das *E. coli*, faz parte da microbiota do trato intestinal do homem e dos animais, controlando a manifestação de bactérias patogênicas e também podendo sintetizar vitaminas úteis ao bom funcionamento do organismo (DUNCAN e HACKNEY, 1994; SUSSMAN, 1997).

O gênero *Escherichia*, pertencente à família Enterobacteriaceae, possui diferentes determinantes antigênicos, caracterizados por diversas combinações de antígenos O (antígenos lipopolissacarídicos somáticos constituintes da membrana externa), K (antígenos polissacarídicos capsulares) e H (antígenos protéicos flagelares), dando origem a vários sorotipos (MOLEND, 1994; SALYERS, 1994; SUSSMAN, 1997). Dos 176 sorogrupos (classificados pelo antígeno O) identificados nos últimos 50 anos (DUNCAN e HACKNEY, 1994), aproximadamente 60 são reconhecidos como organismos patogênicos, causando doenças intestinais e extra - intestinais no homem e nos animais (DUNCAN e HACKNEY, 1994; MOLEND, 1994). Esses patógenos são classificados em 5 categorias bem definidas de acordo com as características clínicas observadas nas síndromes diarreicas, com as propriedades de virulência, com o tipo de interação com a mucosa intestinal, de acordo com as diferenças epidemiológicas apresentadas e sorogrupos específicos (MOLEND, 1994; REED, 1994): *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC); *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC); *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAggEC); *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) e *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) ou “Shiga - toxin - producing” *E. coli* (STEC). As categorias citadas estão relacionadas a doenças intestinais em humanos e animais.

As categorias ETEC e STEC serão descritas com detalhes por serem os grupos isolados de alimentos com maior frequência, motivo pelo qual pesquisamos suas presenças em alimentos lácteos.

1.1 - *Escherichia Coli* Enterotoxigênica (ETEC)

Em relação às bactérias, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é a principal causa da diarreia dos viajantes e da diarreia infantil nos países subdesenvolvidos. Os efeitos provocados por ETEC são semelhantes ao da cólera, porém de forma mais amena (MOLEND, 1994; REED, 1994; SEARS e KAPER, 1996; SUSSMAN, 1997). A diarreia produzida é descrita como profusa, aquosa, sem sangue, com dores abdominais, vômitos e desidratação (MOLEND, 1994). O reservatório de ETEC é o próprio homem. O modo de transmissão é geralmente através de água e alimentos contaminados (MOLEND, 1994; SUSSMAN, 1997).

A patogenicidade das ETEC está relacionada a dois fatores de virulência: a produção de enterotoxinas e expressão de adesinas específicas com as quais a bactéria coloniza o epitélio intestinal. Atualmente são reconhecidas as toxinas termoestáveis (ST), que também apresentam duas variantes (ST-I e ST-II), e as toxinas termolábeis (LT) com dois tipos sorológicos e geneticamente distintos (LT-I e LT-II) (SALYERS, 1994; SEARS e KAPER, 1996; SUSSMAN, 1997).

A toxina ST-I é de baixo peso molecular, 2 kDa (SEARS e KAPER, 1996), codificada pelo gene *estA* localizado em plasmídeo. É produzida como um peptídeo precursor de 72 aminoácidos que é clivado formando um peptídeo de 54 aminoácidos, translocado para o periplasma bacteriano. Um segundo evento proteolítico ocorre após a excreção desse peptídeo para o fluido extracelular, formando a toxina ST-I biologicamente ativa de 18 ou 19 aminoácidos (SEARS e KAPER, 1996; SUSSMAN, 1997). Essa toxina liga-se ao receptor guanilato ciclase do tipo C localizado na membrana apical dos enterócitos do intestino delgado e cólon. A interação toxina ST-I-receptor resulta no aumento de guanosina-mono-fosfato cíclico (cGMP) que estimula a secreção do cloro e/ou inibição da absorção do íon de sódio, causando acúmulo do fluido intestinal (SEARS e KAPER, 1996; SUSSMAN, 1997). A ST-I é solúvel em metanol e ativa no modelo do camundongo recém-nascido (SUSSMAN, 1997).

A toxina ST-II consiste de 71 aminoácidos, dos quais 23 aminoácidos de porção amino terminal formam um peptídeo de sinal, portanto, a toxina ST-II biologicamente ativa consiste

de 48 aminoácidos e é codificada por genes plasmidiais (SUSSMAN, 1997). A ST-II estimula a secreção intestinal por um mecanismo ainda desconhecido, que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos (SEARS e KAPER, 1996; SUSSMAN, 1997), mas causa aumento nos níveis de prostaglandina E_2 (SUSSMAN, 1997). A toxina ST-II é insolúvel em metanol, é ativa em alça ligada intestinal de suínos de 5 a 7 semanas, está associada, principalmente, com diarreia em porco, mas a ST-II também pode ser detectada em amostras de *E. coli* isoladas de humanos com diarreia (OKAMOTO *et al.*, 1993; SUSSMAN, 1997).

LT-I é uma toxina de alto peso molecular, muito semelhante à toxina colérica (CT) em relação a atividade biológica, a determinantes antigênicos, em relação a estrutura, composta por 5 subunidades B e 1 subunidade A e, além disso, os genes codificadores dessas duas toxinas apresentam grande homologia. A subunidade B (11,6 kDa) da toxina LT-I interage com o mesmo receptor da toxina CT, gangliosídeo GM_1 ; a subunidade A passa por um processo proteolítico gerando dois componentes: A_1 (21,8 kDa), contendo atividade ADP-ribosiltransferase e A_2 (5,4 kDa) que está unida as subunidades B e A_1 (SEARS e KAPER, 1996). A subunidade A_1 da toxina LT-I é translocada para o interior dos enterócitos, onde ocorrerá estimulação da adenilciclase, ocorrendo aumento na produção da adenosina-monofosfato cíclico (cAMP), causando alteração no transporte de íons, provocando aumento no fluido intestinal. A toxina LT-I é codificada por genes plasmidiais. A enterotoxina LT-I está associada a diarreia em humano e animais (SEARS e KAPER, 1996).

A LT-II tem a estrutura e o mecanismo de ação semelhante à toxina LT-I (SALYERS, 1994; SEARS e KAPER, 1996). Os genes que codificam a enterotoxina LT-II são cromossômicos (SUSSMAN, 1997). ETEC que produz LT-II tem sido isolada de búfalo, gado, suínos, alimento, mas raramente isolada de humanos. O papel da enterotoxina LT-II na patogenicidade das doenças causadas por *E. coli* não está bem estabelecida (SUSSMAN, 1997).

Outro fator de virulência da ETEC é a adesina ou fator de colonização responsável pela aderência do microrganismo aos enterócitos e à colonização da mucosa intestinal. ETEC possui uma variedade de adesinas, denominadas fimbrias, as quais parecem estar relacionadas com o hospedeiro (SALYERS, 1994; SUSSMAN, 1997). Enquanto algumas fimbrias são detectadas em amostras de ETEC encontradas exclusivamente em humanos, suínos ou bovinos,

outras são menos específicas ao hospedeiro. Até agora, não são conhecidas adesinas compartilhadas tanto por amostras de origem humana como de origem animal. A razão por essa aparente especificidade ao hospedeiro não tem sido investigada com detalhes mas as evidências sugerem que possa estar relacionada à presença de receptores específicos para as adesinas que se encontram no epitélio do hospedeiro (SUSSMAN, 1997). Ao microscópio eletrônico a maioria das fimbrias observada aparece de forma rígida, como uma estrutura filamentosa com diâmetro entre 5 - 7 nm. Certas fimbrias como K88, K99 e CS3 apresentam um diâmetro muito menor, tornando-se filamentos flexíveis, e freqüentemente, são referidas como fibrilas (SALYERS, 1994; SUSSMAN, 1997). As fimbrias e fibrilas são estruturas compostas por subunidades protéicas, semelhantes a uma estrutura helicoidal mas com diferentes números de subunidades. Os *operons* que codificam as adesinas podem estar localizados no plasmídio ou no cromossomo (SALYERS, 1994; SUSSMAN, 1997).

As adesinas específicas de ETEC de origem humana são: CFA/I, CFA/II (EVANS e EVANS, 1978; HONDA e MIWATANI, 1984), CFA/III (HONDA e MIWATANI, 1984), CFA/IV, PCF02 (RICCI *et al.*, 1997), PCFO20 (VIBOUD *et al.*, 1993) e o fator de colonização proposto PCF0159 (THOMAS *et al.*, 1982). Em suínos: K88(F4) (ØRSKOV *et al.*, 1964), K99 (F5) (ØRSKOV *et al.*, 1975), 987P (F6) (NAGY *et al.*, 1976), F42 (YANO *et al.*, 1986) e Fl65 (FAIRBROTHER *et al.*, 1986). Em bovinos e ovinos: K99 (F5) (ØRSKOV *et al.*, 1975) e F41 (de GRAAF e ROORDA, 1982).

1.1.1 - Epidemiologia da doença causada por ETEC

As amostras de ETEC estão associadas a países tropicais subdesenvolvidos afetando viajantes susceptíveis desses locais (SHORE *et al.*, 1974; GORBACH *et al.*, 1975; MERSON *et al.*, 1976; SACK *et al.*, 1977 a). Há vários surtos de diarreia por ETEC relacionados com alimento e água contaminadas (CERQUEIRA *et al.*, 1997; DENG *et al.*, 1996; HOBBS *et al.*, 1976; MITSUDA *et al.*, 1998; ROSENBERG *et al.*, 1977) e, provavelmente, seja transmitida também pelo contato direto de pessoa para pessoa (NYE, 1979).

Estimativas recentes indicam que 3,2 milhões dos 12,9 milhões de mortes de crianças com menos de cinco anos de idade, em países subdesenvolvidos, são provocadas pela diarreia (World Health Organization, 1992). As causas mais importantes de diarreia infantil por bactéria são *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *Shigella* e *Campylobacter jejuni* (HULIAN *et al.*, 1991), e, em adição, ETEC é responsável pela metade dos casos de diarreia dos viajantes (GORBACH *et al.*, 1975; SHORE *et al.*, 1974).

O alto risco de contaminação é devido à alta prevalência de diarreia por ETEC em pessoas de todas as idades dos países subdesenvolvidos, particularmente em crianças. Em países onde as condições higiênicas são satisfatórias, as ETEC não são importantes como causa de diarreia (GUERRANT *et al.*, 1975; NALIN *et al.*, 1975; SACH *et al.*, 1977 b; WADSTROM *et al.*, 1976).

A ingestão oral de amostras de ETEC por voluntários tem mostrado que para estabelecer infecção e diarreia são necessários 10^8 a 10^{10} organismos. O período de incubação e a severidade da infecção depende da dose infectante (DUPONT *et al.*, 1971; LEVINE *et al.*, 1977).

1.2 -“Shiga toxin-producing” *Escherichia coli* (STEC)

“Shiga toxin-producing” *Escherichia coli* (STEC) do sorogrupo O157 e outros sorogrupos, estão associadas às doenças em humanos e animais. Em humanos as manifestações clínicas causadas pelas STEC iniciam-se com Colite Hemorrágica (CH), podendo progredir para Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) ou Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (KUDVA *et al.*, 1997; SALYERS, 1994; SEARS e KAPER, 1996). Múltiplos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade de STEC, tais como: a produção das toxinas “Shiga-like-toxin” I e/ ou II, codificadas por bacteriófagos temperados; a presença de adesinas; produção de hemolisinas; a habilidade de causar lesões “attaching-effacing” através de uma proteína (94 kDa) que localiza-se na membrana externa da bactéria, denominada intimina, codificada pelo gene *eae*, encontrada também entre as *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC) (KUDVA *et al.*, 1997; PATON e PATON, 1998; SALYERS, 1994; SEARS e

KAPER, 1996). A presença das adesinas F107 e K99 estão associadas aos fatores de virulência da STEC isolada de animais (KUDVA *et al.*, 1997)

Essas citotoxinas têm várias nomenclaturas como “Shiga-like-toxin” (SLT) ou verotoxina (VT). Na tentativa de evitar mais confusões, CALDERWOOD *et al.*, 1996, propuseram uma única nomenclatura para todas as toxinas que apresentem alto grau de homologia em relação à estrutura e à função biológica e pertençam à família “Shiga toxin”. A “Shiga toxin” sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo 1, através do gene *stx*, continua com a mesma nomenclatura, Stx; a toxina “Shiga - like toxin” I (SLT-I) ou verotoxina 1 (VT-1), produzida por *Escherichia coli*, através do gene *stx*₁, recebeu a nomenclatura Stx1, e as outras toxinas SLT-II ou VT-2, codificada pelo gene *stx*₂, foi denominada Stx2; SLT-IIc ou VT2c, codificado pelo gene *stx*_{2c}, Stx2c e a toxina SLT-IIe ou VT-2e, codificado pelo gene *stx*_{2e}, Stx2e.

Os membros da família “Shiga toxin” são toxinas de aproximadamente 70 kDa (halotoxinas) compostas de uma subunidade A catalítica de 32 kDa e de uma subunidade B multimérica, constituída por 5 monômeros de 7,7 kDa, que está envolvida na ligação da toxina aos receptores glicolipídicos que se encontram na membrana plasmática das células alvos (O'BRIEN e HOLMES, 1987). O receptor dos membros da família “Shiga toxin” é a globotriosil ceramida, constituída por α -(1 → 4)-galactose- β -(1 → 4) glicose ceramida (Gb₃) (98, 133). A exceção é para a toxina Stx2e que liga-se principalmente ao receptor globotetraosil ceramida (Gb₄) (DeGRANDIS *et al.*, 1989; SAMUEL *et al.*, 1990; SUSSMAN, 1997). Uma vez havendo a interação entre a subunidade B e o seu receptor, ocorre a internalização da toxina pelo processo de endocitose mediado pelo receptor (SANDVIG e van DEURS, 1996). A toxina fica envolvida por uma vesícula e em algumas células podem ocorrer a fusão dessa vesícula com lisossomo celular, causando sua degradação. Entretanto, em células particularmente sensíveis a toxina, da família “Shiga toxin”, a vesícula endossomal contendo complexos receptor - toxina, dirige-se ao Complexo de Golgi e depois para o retículo endoplasmático antes de ser transportada para o citoplasma (SANDVIG *et al.*, 1992; SANDVIG *et al.*, 1994). As toxinas da família “Shiga toxin” causam a inibição irreversível da síntese protéica nas células eucarióticas. A subunidade A das toxinas têm atividade N-glicosidase, a qual cliva um resíduo adenina do RNA ribossômico 28 S, resultando a inibição da

síntese protéica e morte celular (ENDO *et al.*, 1988; PATON e PATON, 1998; SAXENA *et al.*, 1989; SKINEER e JACKSON, 1997; SUSSMAN, 1997).

A sequência de nucleotídeos dos genes que codificam Stx de *S. dysenteriae*, bem como as Stx1 e Stx2 de *E. coli*, foi determinado no final da década de 1980 (CALDERWOOD *et al.*, 1987; DeGRANDIS *et al.*, 1987; JACKSON *et al.*, 1987 a; JACKSON *et al.*, 1987 b; KOZLOV *et al.*, 1988; STROCKBINE *et al.*, 1988). O *operon* apresenta uma estrutura comum, consistindo de uma única unidade de transcrição, codificando primeiro a subunidade A seguida da subunidade B. A sequência de aminoácidos da subunidade A foi de 315, 315 e 318 aminoácidos nas toxinas Stx, Stx1 e Stx2, respectivamente, e 89 aminoácidos para a subunidade B de todas as toxinas (CALDERWOOD *et al.*, 1987; DeGRANDIS *et al.*, 1987). A comparação entre a sequência de aminoácidos indicou que Stx e Stx1 são idênticas (havendo apenas um aminoácido diferente na subunidade A); enquanto Stx2 tem somente 56% de similaridade com as outras toxinas, tanto para a subunidade A como para a subunidade B (JACKSON *et al.*, 1987 a). A maioria das regiões altamente conservada apresenta-se no sítio ativo (HOVDE *et al.*, 1988; YAMASAKI *et al.*, 1991).

Estudos adicionais demonstraram que STEC isoladas de suínos com doença do edema produzem uma variante de Stx 2 (designada Stx 2e) (MARQUES *et al.*, 1987). Embora a toxina tenha sido neutralizada pelo anti - Stx2 policlonal, essa toxina variante poderia ser distinguida da Stx 2 pela ausência de citotoxicidade em cultura de célula HeLa, carcinoma de útero humano (PATON e PATON, 1998).

Em 1988, foi relatado a sequência de um *operon* que codifica a toxina variante Stx2e (GYLES *et al.*, 1988; WEINSTEIN *et al.*, 1988). A sequência de aminoácidos da subunidade A da Stx2e apresentou um aminoácido a mais que a subunidade A da toxina Stx2 e exibiu uma homologia de 94%. A subunidade B da Stx2e apresentou dois aminoácidos a menos que a subunidade B da toxina Stx2 e 87% de homologia. Estudos envolvendo a construção de quimeras entre os *operons* de Stx2 e Stx2e demonstraram que as variações na subunidade B da Stx2e com relação a subunidade B da Stx2 são responsáveis pela redução de citotoxicidade de Stx2e em cultura de célula HeLa, a qual não apresenta o receptor Gb₄ (WEINSTEIN *et al.*, 1989).

Estudos no início da década de 1980 estabeleceram que Stx1 e Stx2 são codificadas por uma variedade de bacteriófagos (O'BRIEN *et al.*, 1984; SCOTLAND *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1984). O envolvimento de bacteriófagos e transposons pode ajudar a explicar porque muitas amostras de STEC perdem seus genes das toxinas da família Shiga toxin após subcultivo “in vitro” (KARCH *et al.*, 1992). E em contraste as toxinas Stx1 e Stx2, o gene que codifica a Stx2e está localizado no cromossomo bacteriano (LIOR, 1994).

1.2.1 - Epidemiologia da doença causada por STEC

Foi reconhecido há vários anos que amostras STEC causadoras de doenças em humanos pertencem a uma grande variedade de sorotipos (PATON e PATON, 1998). Embora não tenha representado o grupo inicial de isolados de STEC descrito por KONOWALCHUK, 1977, o sorotipo O157:H7 foi o primeiro tipo de STEC a estar relacionado com surtos de Colite Hemorrágica e Síndrome Urêmica Hemolítica. Em muitas partes do mundo, amostras de STEC pertencentes a esse sorotipo (bem como O157:H) parecem ser a causa mais comum de doenças em humanos. Entretanto, a facilidade relativa de isolamento desse sorotipo com base na sua incapacidade de fermentar sorbitol pode estar contribuindo para uma superestimação de sua prevalência com respeito aos outros sorotipos de STEC. Outros sorogrupos comuns de STEC incluem O26, O91, O103 e O111, e em alguns estudos, esses sorogrupos têm sido a causa predominante de doenças em humanos (GOLDWATER e BETTELHEIM, 1994; GOLDWATER e BETTELHEIM, 1998; PIERARD *et al.*, 1994). Há alguns relatos de múltiplos sorotipos de STEC isolados de um único paciente, e em tais circunstâncias, a contribuição de cada tipo na patogenicidade da doença é difícil de avaliar. Quando um dos tipos isolados é O157, há uma tendência (talvez incorreta) de ignorar o significado etiológico dos outros (PATON e PATON, 1998).

O gado tem sido considerado o principal reservatório de amostras de STEC, incluindo aquelas pertencentes ao sorotipo O157:H7. Entretanto, os dados epidemiológicos têm revelado que amostras de STEC também são prevalentes no trato gastrointestinal de outros animais domésticos, incluindo as ovelhas, porcos, cabras, cachorros e gatos (BEUTIN *et al.*, 1993;

CAPRIOLI *et al.*, 1993; KARMALI, 1989; KUDVA *et al.*, 1996; WRAY *et al.*, 1994). A estimativa da incidência de hospedeiros de STEC é complicada devido ao fato de que a eliminação fecal pode ser transitória e influenciada por vários fatores incluindo a dieta, estresse, densidade populacional, região geográfica e sazonal (CLARKE *et al.*, 1994; KOZLOV *et al.*, 1988). Estudos sorológicos têm sugerido que a maioria do gado tem sido exposto a STEC em alguma fase durante sua vida (CLARKE *et al.*, 1994; PIRRO *et al.*, 1995). Enquanto muitos animais domésticos portadores de STEC são assintomáticos, certas amostras de STEC são capazes de causar diarreia em gado, particularmente em bezerros (GYLES, 1992; SMITH e SCOTLAND, 1988). Amostras de STEC também têm sido detectadas em gatos e cachorros com diarreia (ABAAS *et al.*, 1989; HAMMERMUELLER *et al.*, 1995).

Infecção natural e experimental de bezerros com amostras de STEC O111 resultaram em colites com “attachment - effacement” da mucosa colonizada (SCHOONDERWOERD *et al.*, 1988). Outros estudos envolvendo infecção experimental com STEC O157:H7 demonstraram que o gado adulto e bezerros poderiam ser hospedeiros transitórios, mas somente bezerro neonatal desenvolve lesões intestinais significantes (CRAY e MOON, 1995; DEAN-NYSTROM *et al.*, 1997).

Por outro lado, a doença do edema em suínos, que também está relacionada à STEC é caracterizada por sintomas neurológicos incluindo ataxia, convulsões e paralisia: o edema está presente nas pálpebras, no cérebro, estômago, intestino e mesentério do cólon. Essa doença está associada a alguns sorotipos de STEC (os mais comuns são O138:K81, O139:K82 e O141:K85); esses sorotipos não estão associados com doenças em humanos e produzem a toxina Stx2e (IMBERECHTS *et al.*, 1992; MORRIS e SOJKA, 1985; NIELSEN e CLUGSTON, 1971). A subunidade B dessa toxina tem um receptor glicolipídico específico diferente dos outros membros da família “Shiga toxin”, isto altera o tropismo de tecido da toxina, explicando a distinção dos sintomas clínicos da doença do edema descritos acima (PATON e PATON, 1998).

STEC pode potencialmente contaminar os alimentos de origem animal; a forma mais comum de contaminação é através de carne com conteúdo fecal ou intestinal após o abate (CLARKE *et al.*, 1994; DOYLE, 1991). Uma das fontes de contaminação mais comum de STEC em humanos é o hambúrguer feito de carne moída, e um número elevado de surtos de

infecções por O157:H7 tem sido relacionado com essa fonte (KARMALI, 1989). A carne moída pode ter um risco particular por duas razões: primeiro, a prevalência de uma grande quantidade de organismos patogênicos de STEC tais como O157:H7 que pode ser maior em gado do que em outras espécies animais; segundo, a contaminação por STEC na superfície da carne torna-se igualmente distribuída durante o processo de moer, e, mesmo que os pedaços de hambúrgueres sejam completamente cozidos, os organismos de STEC que se encontram no centro da carne podem não ser expostos a temperatura letal (PATON e PATON, 1998). Outras fontes de contaminação de STEC incluem: os produtos de laticínios crus ou inadequadamente pasteurizados; produtos de carne, secos ou fermentados tais como salame e defumados; produtos de vegetais e frutas que estiveram em contato com adubo ou estrume de animais domésticos durante algum estágio de cultivo ou manuseio (ADAK *et al.*, 1997; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995 a; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995 b; GLYNN *et al.*, 1997; KEENE *et al.*, 1997; MORGAN *et al.*, 1993; PATON *et al.*, 1996; TSCHAPE *et al.*, 1994).

A transmissão de STEC de pessoa para pessoa tem sido bem documentada durante os surtos e pode também ter uma proporção significativa de casos esporádicos (GRIFFIN e TAUXE, 1991; REIDA *et al.*, 1994). Em um estudo de pacientes infectados com O157:H7, a coleta de fezes foi feita dentro de 1 a 6 dias após o início da diarreia ou colite hemorrágica e durante a fase aguda dos pacientes que estavam com Síndrome Urêmica Hemolítica (7 a 17 dias após a diarreia), durante o período de 1988 a 1993, com intervalo de 2 a 4 dias. A duração média de eliminação de STEC nas fezes foi maior em pacientes com SUH (21 dias, o máximo foi de 124 dias) em relação aos pacientes com diarreia ou colite hemorrágica (13 dias, o máximo foi de 62 dias) (KARCH *et al.*, 1995).

1.3 - Características Bioquímicas e de Crescimento

Os coliformes totais incluem microrganismos pertencentes à família Enterobacteriaceae, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados às temperaturas de 35 - 37° C por 48 horas (FRANCO, 1996). Os coliformes denominados fecais representam os

microrganismos capazes de continuar fermentando a lactose com produção de gás, quando incubados às temperaturas de 44,5°C a 45,5°C. Os gêneros pertencentes a esse grupo são: *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (FRANCO, 1996). Destes, apenas *E. coli* tem como hábitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais, *Klebsiella* e *Enterobacter*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solos (FRANCO, 1996).

Os testes tradicionais aplicados na detecção de coliformes fecais utilizam temperatura de 45,5°C, entretanto, a temperatura máxima que permite o crescimento de *E. coli* do sorotipo O157:H7 é de 43°C (MERMELSTEIN, 1993) e de produzir gás é de 41° C (RAGHUBEER e MATCHES, 1990). Alguns estudos têm revelado que a temperatura para *E. coli* O157:H7 crescer e produzir gás no meio de cultura *Escherichia Coli* (EC) dentro de 48 h deve estar entre 19,3 a 41,0° C (RAGHUBEER e MATCHES, 1990). Esse microrganismo apresenta um bom crescimento na temperatura de 37° C (77). O crescimento de *E. coli* O157:H7 sem produção de gás foi observado em temperaturas de 16,4° C e 42,5° C (RAGHUBEER e MATCHES, 1990).

A técnica atualmente utilizada para a detecção e enumeração de coliformes e *E. coli* é o Número Mais Provável (NMP), utilizando caldo lauril sulfato (para a recuperação das células injuriadas), caldo bile lactose verde brilhante (para a determinação de coliformes totais) e caldo EC (para a determinação de coliformes fecais e *E. coli*); outra técnica utiliza membrana de celulose sobre o meio ágar bile triptona e meios de cultura contendo os substratos fluorogênico 4 metil- umbeliferil β - D - glicuronídeo (MUG) e o substrato cromogênico 5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indolil - β - D - glicuronídel (X-GLUC ou BCIG) para a detecção da enzima β -glucuronidase (GUD) (BOER, 1998). A técnica de três - tubos NMP para enumeração de coliformes e *E. coli* em alimentos é sensível, mas requer 3 a 6 dias para a sua realização. A utilização de membrana - filtrante é simples e sensível, mas, embora a membrana de celulose seja de 85 mm apresenta um custo elevado (BOER, 1998). Há outras técnicas para a análise de coliformes totais e *E. coli* como o Petrifilm™ contagem de *E. coli* em placa (3M, Minneapolis, MN, USA), SimPlate entre outros (BOER, 1998).

No entanto, aproximadamente 97% das *E. coli* possuem a enzima β -glucuronidase e 80,3% são sorbitol positivos. As amostras STEC O157:H7 Stx⁺ não fermentam sorbitol dentro

de 24 h de incubação e não possuem a enzima β -glucuronidase, tendo resultado negativo para o teste MUG (ADAK, *et al.*, 1997). Outros tipos de bactérias como *Enterobacter*, *Proteus* e *Hafnia* possuem características similares de *E. coli* O157:H7, tais como sorbitol negativo e MUG negativo (PADHYE e DOYLE, 1991 b).

Portanto, o teste MUG usado para detectar a atividade da enzima glucuronidase da *E. coli* não identifica o sorotipo *E. coli* O157:H7, e as temperaturas elevadas utilizadas nos testes tradicionais dificultam a identificação desse sorotipo.

Entretanto, amostras de STEC do sorogrupo O157, isoladas na Alemanha, fermentaram o sorbitol em 24h e apresentaram resultado positivo no teste MUG, tornando a identificação deste sorotipo mais difícil (GUNZER, *et al.*, 1992). Amostras atípicas de *E. coli* O157:H7 urease positivas têm sido ocasionalmente encontradas (LIOR, 1994).

Para o isolamento de *E. coli* O157:H7, a maioria dos métodos aceitos envolve a observação da não fermentação do sorbitol em meio ágar MacConkey sorbitol (SMAC) onde apresentam colônias incolores (sorbitol negativo) (BOER, 1998). Entretanto, são necessários outros testes para a confirmação de *E. coli* do sorotipo O157:H7 devido a possível presença de outros microrganismos não fermentadores de sorbitol tais como *Proteus* spp., *Aeromonas* spp. e outras *E. coli*. A seletividade do ágar SMAC foi melhorada pela adição de ramnose e cefixima, resultando em CR-SMAC. Ao contrário da maioria das amostras de *E. coli* não fermentadoras de sorbitol, amostras *E. coli* O157:H7 não fermentam ramnose, e a baixa concentração do antibiótico cefixima inibe *Proteus* spp. mas não *E. coli*. O meio de cultura ágar CR-SMAC foi alterado, substituindo ramnose por telurito, surgindo CT-SMAC. O telurito inibe o crescimento de outras amostras de *E. coli* que não são do sorogrupo O157 (BOER, 1998).

O fato de que a produção de toxinas é o principal fator de virulência dos STEC, a sua detecção pode ser amplamente melhorada e simplificada utilizando protocolos tais como “immuno-blot” ou “colony-blot” elaborados para detectarem colônias produtoras de toxinas ou a detecção de genes que codificam as toxinas através de sonda de DNA para Stx1 e Stx2 (LIOR, 1994).

A técnica de PCR permite a detecção e identificação dos genes que codificam os diferentes tipos de toxinas presentes em amostras isoladas de fezes, ou dos caldos de

enriquecimento utilizados em análise microbiológica de alimentos com um elevado grau de especificidade, sensibilidade e agilidade. Há outras técnicas moleculares utilizadas para a investigação de amostras de STEC em alimentos tais como: Análise do Perfil de Plasmídeos, Eletroforese de Enzimas Multilocus, “Pulse-Field Gel Eletroforese” e PCR com primers arbitrários (RAPD) (LIOR, 1994).

Há outros protocolos para o isolamento de *E. coli* O157:H7 de alimentos e fezes baseados na técnica de separação imunomagnética, onde a bactéria liga-se a um anticorpo específico conjugado a uma partícula. Essa técnica tem a habilidade de concentrar as células de uma determinada amostra que contém baixo número de bactéria e de separar as células O157 das outras pertencentes a flora (LIOR, 1994). Entretanto, técnicas utilizadas para detectar antígenos O157 encontrados em amostras STEC do sorogrupo O157 apresentam resultados falso-positivos. O antisoro para *E. coli* O157:H7 apresenta reação cruzada com bactérias de diferentes gêneros tais como *Salmonella* spp., algumas amostras de *Yersinia enterocolitica* e *Brucella* spp. Pesquisas recentes realizadas por Padhye e Doyle, 1991, identificaram duas proteínas da membrana externa que são específicas para *E. coli* dos sorotipos O157:H7 e O26:H11 e um anticorpo monoclonal (Mab), 4E8C12, específico para essas proteínas foi desenvolvido (PADHYE e DOYLE, 1991 a).

A presença de citotoxinas também pode ser demonstrada através de culturas de células tais como as culturas de células Vero (rim de macaco verde africano) e HeLa (carcinoma de útero humano). A verificação de atividade citotóxica sobre células Vero é preferível, porque algumas citotoxinas como Stx2e e variantes da Stx2 apresentam pouca ou nenhuma atividade citotóxica sobre células HeLa (LIOR, 1994).

1.4 *Escherichia coli* em alimentos

Após a Segunda Guerra Mundial, os problemas com a saúde pública passaram a ser menos preocupantes para as autoridades governamentais, que começaram a dar uma atenção maior para os efeitos a longo prazo das substâncias químicas adicionadas aos alimentos, pois acreditavam que as doenças infecciosas estavam sob controle. Na década passada, entretanto,

houve uma mudança nas prioridades da segurança dos alimentos que passou da questão química para o perigo dos microrganismos, pelo menos na América do Norte. Essa mudança ocorreu devido ao reconhecimento de novos agentes ameaçadores à vida, à ocorrência contínua de surtos transmitidos através de alimentos e água e à aparente incapacidade das autoridades da saúde pública de preveni-los (TODD, 1997).

“Shiga - toxin - producing” - *Escherichia coli* (STEC) do sorogrupo O157 é a maior causa de sérios surtos e casos esporádicos de Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) (GRIF, *et al.*, 1998). Amostras de STEC têm sido associadas a surtos e casos esporádicos de CH na América do Norte e Inglaterra e a casos esporádicos de SUH no Canadá e Inglaterra. A CH e a SUH têm sido associadas à elevada taxa de morbidade e mortalidade (ZADIK *et al.*, 1992). O principal reservatório de *E. coli* O157 parece ser o gado e uma variedade de alimentos, desde batatas cruas até folheados de peru têm sido relacionados em surtos, mas o leite e produtos de carne são os mais envolvidos (ANSAY e KASPAR, 1997; CERQUEIRA *et al.*, 1997; GRIF *et al.*, 1998; QUINTO e CEPEDA, 1997). A maioria dos surtos de colite hemorrágica tem sido associado ao consumo de carne contaminada e que não foi devidamente cozida, leite subpasteurizado, vegetais contaminados com material fecal, água e cidra de maçã (KUDVA *et al.*, 1997; PADHYE e DOYLE, 1991 b). Esse microrganismo tem sido isolado de carne moída, carne de porco, de aves e de cordeiro (PADHYE e DOYLE, 1991 b). A cidra de maçã feita de maçã contaminada com material fecal foi envolvida em um surto em Massachusetts, Estados Unidos, e há alguns anos atrás foi envolvida em um surto no Canadá (ANSAY e KASPAR, 1997; LIOR, 1994). A maionese e a salsicha fermentada tem sido o veículo de transmissão de *E. coli* O157:H7 em um surto recente (ANSAY e KASPAR, 1997; MASSA *et al.*, 1997). O iogurte, o qual sempre foi considerado seguro devido a sua natureza intrínseca, foi envolvido em uma infecção fatal. Esses surtos sugerem que *E. coli* O157:H7 pode ser tolerante às condições ácidas, particularmente sob baixas temperaturas (ANSAY e KASPAR, 1997; MASSA *et al.*, 1997).

A água contaminada e a transmissão de pessoa para pessoa também contribuem de maneira significativa para as doenças em humanos por esse patógeno (KUDVA *et al.*, 1996; MASSA *et al.*, 1997; ZADIK *et al.*, 1992).

Escherichia coli enterotoxigênicas (ETEC) constituem um dos mais importantes grupos entre as *E. coli* que causam diarreia (QUINTO e CEPEDA, 1997; REED, 1994). Doenças causadas por ETEC têm sido associadas com a ingestão de alimentos e água contaminados (CERQUEIRA *et al.*, 1997; DENG *et al.*, 1996). Em 1996, um grande surto devido a ETEC do sorotipo O25:NM (não móvel) ocorreu em quatro escolas em Yokohama, Japão. A fonte de contaminação foi patê de atum (MITSUDA *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos, 13 surtos de gastroenterites causados por ETEC foram relatados pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção desde 1975, dos quais 9 foram devidos a alimentos contaminados. Os relatos das fontes de infecções incluem água contaminada com detritos humanos, alimentos contaminados durante o manuseio, produtos de laticínios tais como queijo semi-duro e saladas contendo vegetais crus (MITSUDA *et al.*, 1998). No México, as crianças infectadas com ETEC produtora da enterotoxina termo - lábil (LT) aumentaram em 400 - 500% durante a estação da chuva. Havia um aumento similar entre as crianças que recebiam um líquido ralo de aveia como alimento, mas os riscos de infecção foram reduzidos pela ingestão de leite materno contendo anticorpos para LT (TODD, 1997).

Escherichia coli normalmente reside e multiplica-se no intestino dos animais e humanos. Devido a atual tecnologia industrial de alimentos, os produtos podem ser contaminados em diversos pontos: durante o abate, processamento, distribuição, armazenamento, durante o preparo do alimento nas cozinhas e na hora de servi - los. O alimento também pode ter contaminação cruzada durante o processamento do produto e preparação pelo contato com superfície de mesas, ou equipamentos que tenham sido anteriormente contaminados (DORN *et al.*, 1995).

Os riscos e as conseqüências da transmissão de patógenos pelos alimentos e água estão em primeiro plano nas preocupações relacionadas a saúde pública, e uma forte pressão está sendo aplicada sobre a agricultura para que seja implementado imediatamente um controle sobre as fazendas. A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos está considerando a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) como uma nova forma para a revisão dos Programas de Segurança dos Alimentos nos Estados Unidos, por considerá-lo a base da ciência, um procedimento sistemático para prevenir os problemas relacionados com a segurança dos alimentos (CULLOR, 1997).

O sistema APPCC auxilia na identificação de fatores que afetam diretamente a segurança de um produto.

1.4.1 - *Escherichia coli* em Produtos Lácteos

Qualquer alimento rico em proteínas e carboidratos é particularmente vulnerável à contaminação por microrganismos.

Vários tipos de alimentos, dentre eles produtos de laticínios como leite cru e queijos, têm sido envolvidos em surtos devido a *Escherichia coli*. A presença desse microrganismo em alimentos lácteos pode ser devido a uma pasteurização incorreta, já que quando pasteurizado de maneira adequada esse patógeno é eliminado, ou ocorreu a contaminação após a pasteurização (JAKABI e FRANCO, 1991; OMBUI *et al.*, 1994; VESSONI *et al.*, 1986). A ocorrência desta bactéria indica que as práticas higiênico - sanitárias foram inadequadas sugerindo a existência de outros germes patogênicos como *Salmonella*, *Shigella*, *Entamoebas*, *Staphylococcus aureus* e vírus entéricos que ocorrem nas áreas de produção, beneficiamento do leite e pelos manipuladores (TAVARES e GARCIA, 1993).

1.4.1.1 - Leite Cru:

No Brasil, por legislação do Ministério da Agricultura, o leite pode ser classificado em três tipos: A, B e C, que diferem entre si, não só pelo teor de gordura, como também pela sua obtenção e qualidade microbiológica.

O leite tipo A, beneficiado dentro da própria granja leiteira, sem mistura com leites de outras procedências, é proveniente de vacas identificadas e controladas permanentemente por médicos veterinários, seguindo todos os programas de sanidade de rebanho. Deve ser pasteurizado logo após a ordenha, que é mecânica e em circuito fechado (Secretaria de Inspeção de Produto Animal do Ministério da Agricultura, 29/10/84).

O leite tipo B, normalmente não é beneficiado no próprio local, sendo enviado para usinas de beneficiamento. As fêmeas são identificadas e controladas por médicos veterinários. A ordenha pode ser manual ou mecânica em estábulos, ou salas de ordenha registradas. Obedece horários para sua chegada no estabelecimento industrial (Secretaria de Inspeção de Produto Animal do Ministério da Agricultura, 26/06/84).

O leite tipo C pode ser beneficiado, ou então destinado à industrialização. A ordenha pode ser manual ou mecânica. O leite não precisa ser resfriado e deve chegar até as 12:00 h no estabelecimento industrial (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62).

O leite proveniente da fazenda pode ser um veículo de patógenos, inclusive de *Escherichia coli* patogênica. A higiene do leite consiste em evitar por todos os meios a conspurcação desse produto, o que sempre resulta na invasão de bactérias prejudiciais às técnicas industriais e a saúde do homem (PRATA, 1996).

Os cuidados na obtenção higiênica do leite devem começar na fonte de produção, isto é, durante a ordenha. Obtido de animais sadios e utilizando-se de práticas higiênicas, o leite recém-ordenhado contém poucos microrganismos. Nesse caso, as bactérias indesejáveis à saúde ou práticas industriais estarão ausentes, ou, quando presentes, em número muito reduzido e facilmente controlável. O leite produzido sem os preceitos de higiene torna-se produto de qualidade inferior, mesmo que se lhe dispensem posteriormente os maiores cuidados e melhores tratamentos (PRATA, 1996).

A contaminação bacteriana do leite pode advir de uma ou mais das seguintes condições: do interior do úbere, em casos de infecção; do exterior dos úberes e áreas próximas da glândula mamária; da superfície dos vasilhames, equipamentos, incluindo tanques e latões; do ar ambiental; da falta de noções de higiene pessoal dos ordenhadores (PRATA, 1996).

1.4.1.2 - Leite Pasteurizado e UHT:

A pasteurização do leite é um processo que visa destruir, pelo emprego conveniente do calor, quase todos os microrganismos presentes, procurando alterar o menos possível as suas

propriedades físicas e químicas. Admite-se dois tipos de pasteurização (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62):

- Pasteurização lenta: consiste no aquecimento do leite a 62-65° C por 30 minutos, mantendo-se o leite em grande volume sob agitação mecânica lenta, em aparelhagem própria e, após resfriado à temperatura igual ou inferior a 5° C;
- Pasteurização rápida: consiste no aquecimento do leite em camada laminar a 72-75° C por 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria e resfriamento à temperatura igual ou inferior a 5° C;

Entende-se por leite UHT (ultra alta temperatura) aquele que foi submetido durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130-150° C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior à 32° C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1996).

Após a ordenha, o leite passará pelo processo de pasteurização que deverá eliminar os microrganismos patogênicos. Mas mesmo assim o leite cru e o pasteurizado estão sendo veículos de transmissão de patógenos, principalmente de *E. coli* patogênicas. O isolamento de *E. coli* patogênica de leite cru pode ser uma causa potencial de enterites, especialmente se a pasteurização não for feita adequadamente (OMBUI *et al.*, 1994).

Franco, *et al.*, em 1991 na cidade de São Paulo, analisaram 96 amostras de alimento de origem animal, e dessas, 1 amostra de leite pasteurizado foi positiva para *E. coli* produtora da enterotoxina LT-II.

Em um surto entre crianças do jardim da infância de Ontario (Canadá) causado pelo consumo de leite cru, o microrganismo *E. coli* O157:H7 foi detectado e 3 crianças (7%) dos casos desenvolveram a síndrome urêmica hemolítica (KARMALI, 1989).

Allmann, *et al.*, em 1995 na França, analisaram 54 amostras de leite cru e 36 produtos de laticínios derivados de leite cru. O microrganismo *E. coli* foi detectado através do PCR em 41 amostras (46%). Dessas 41 amostras, 11 amostras (27%) foram positivas para *E. coli* produtora da enterotoxina LT-I e 11 amostras (27%) foram positivas para *E. coli* produtora da enterotoxina ST-I. Dessas 22 amostras, 4 foram positivas para *E. coli* produtora de ambas toxinas.

1.4.1.3 - Queijo:

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite fresco ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados natural ou artificialmente, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (LERAYER *et al.*, 1998; Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62). Entende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após a sua fabricação, e por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo (LERAYER *et al.*, 1998). Para efeito de padronização dos queijos é estabelecida a seguinte nomenclatura, de acordo com a consistência do produtos: moles (Minas frescal, Ricota frescal, Requeijão, entre outros); semi-duros (Minas Padrão, Prato, tipo Edam ou Reno, entre outros); e duros (Minas duro e os tipos Parmesão, entre outros) (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62). Vários tipos de queijo, provenientes de leite pasteurizado inadequadamente ou de leite cru, vêm sendo associados a vários surtos de *Escherichia coli* patogênica.

Quinto e Cepeda., em 1997 na Espanha observaram uma frequência de 0,4% de *E. coli* enterotoxigênica produtora de LT em queijo preparado com leite cru e frequência nula em queijo produzido com leite pasteurizado. Também observaram uma frequência de 0,4% de *E. coli* verotoxigênica produtora da toxina Stx em queijo preparado com leite cru e frequência nula em queijo produzido com leite pasteurizado.

De 1970 a 1990 nos Estados Unidos, surtos de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* do grupo C e *Brucella melitensis* foram associados ao consumo de queijo (ALTEKRUSE *et al.*, 1998). Altekruise *et ali*, 1998 identificaram 32 surtos associados com queijo durante 1973 à 1992. Dos 32 surtos, 11 foram atribuídos a contaminação na fazenda durante a fabricação do produto, ou durante o processamento, antes da distribuição. Dos 5 surtos, o estado da pasteurização do leite utilizado na fabricação do queijo não foi determinado; 3 surtos foram associados com queijo preparados

com leite indevidamente pasteurizado; 2 surtos foram relacionados com queijo preparados com leite cru e 1 surto foi relacionado com queijo que foi contaminado após a pasteurização.

1.4.1.4 - Manteiga:

Entende-se por manteiga o produto resultante da batida do creme de leite fresco ou fermentado pela adição de fermento láctico selecionado, ao qual se incorpore ou não sal (cloreto de sódio). A designação manteiga é reservada, exclusivamente, ao produto obtido do leite de vaca (LERAYER *et al.*, 1998; Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62). Quando a matéria prima for procedente de outra espécie animal, o produto será designado com o nome de manteiga, acrescido da designação da espécie que lhe deu origem (LERAYER *et al.*, 1998; Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62). A manteiga pode ser classificada como manteiga comum, manteiga de primeira qualidade manteiga ou extra (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, 25/06/62).

Cooke, *et al.*, em 1984, analisaram 7000 amostras de produtos de laticínios, incluindo manteiga, queijo entre outros. O microrganismo *E. coli* foi detectado em 38 amostras de leite em pó, 34 produtos ricos em proteína, em 48 amostras de manteiga e em 35 amostras de queijo.

Kulshrestha, em 1990, analisou 169 amostras de produtos de laticínios, incluindo 15 amostras de queijo, 12 amostras de manteiga entre outros produtos. O microrganismo *E. coli* foi detectado em 6 amostras (40%) de queijo e em 1 amostra (8,3%) de manteiga. As *E. coli* isoladas do queijo pertenciam aos sorogrupos O18, O126 e O128 e as identificadas na manteiga pertenciam ao sorogrupo O128.

Abbar *et al.*, em 1987 no Iraque analisaram 30 amostras de manteiga das quais 41,1% das amostras analisadas foram positivas para *E. coli*. Dessas 41,1% foram isoladas 58 colônias de *E. coli* das quais 7 colônias foram positivas para *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e 3 colônias de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produtora da enterotoxina ST.

II - OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi verificar a ocorrência de *Escherichia coli* em produtos de laticínios (leite pasteurizado tipos A, B, C; manteiga e queijo). Isolar o microrganismo desses produtos lácteos.

Verificar se as amostras de *E. coli* isoladas pertenciam aos grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) ou “Shiga-toxin-producing” *E.coli* (STEC).

Fatores de virulência estudados:

- enterotoxina termoestável I (ST-I);
- enterotoxina termolábel I (LT-I);
- citotoxina Shiga - toxin I (Stx1);
- citotoxina Shiga - toxin II (Stx2).

III -. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Amostras de *E.coli*:

3.1.1 - Padrões:

Foram utilizadas amostras padrão de *E.coli* F 82 (O101:K⁻), produtora de enterotoxina ST-I; 40 T, produtora de LT-I e O157:H7, produtora de citotoxinas Stx1 e Stx2. A amostra DH5 α , foi usada como controle negativo. Todas as amostras pertencem à Bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.2 - Produtos Lácteos:

Os produtos de laticínios industrializados são marcas conhecidas que não serão citados, sendo designados por letras. Os produtos foram coletados nos municípios de Monte Mor, Campinas e Bragança Paulista, dentro do período de validade. Após a aquisição dos produtos, estes foram transportados dentro de bolsa térmica, imediatamente para o laboratório e conservados em geladeira até o momento da análise microbiológica que não foi superior a 8 horas.

3.1.2.1 - Leite:

Foram examinados 105 amostras de leite pasteurizado do tipo A, B e C:

- 35 amostras de leite pasteurizado do tipo A: 25 amostras de leite da marca **D** e 10 amostras de leite da marca **E**;
- 35 amostras de leite pasteurizado do tipo B: 15 amostras da marca **F**; 10 amostras da marca **G**; 10 amostras da marca **H**;
- 35 amostras de leite pasteurizado do tipo C: 10 amostras da marca **F**; 5 amostras da marca **I**; 15 amostras da marca **J** e 5 amostras da marca **H**;

3.1.2.2 - Manteiga:

Foram analisadas 81 amostras de manteiga:

- 15 amostras de manteiga comum: 3 da marca **G**; 9 da marca **K** e 3 da marca **L**;
- 27 amostras de manteiga de 1º Qualidade: 9 da marca **M**; 9 da marca **N** e 9 da marca **F**;
- 39 amostras de manteiga Extra: 3 da marca **O**; 9 da marca **P**; 9 da marca **Q**; 6 da marca **R**; 3 da marca **S**; 6 da marca **T** e 3 da marca **U**, coletadas no município de Campinas.

3.1.2.3 - Queijo:

Foram analisadas, 81 amostras de queijo provenientes de leite pasteurizado:

- 63 amostras de queijo Minas Frescal: 9 da marca **V**; 3 da marca **W**; 9 da marca **X**; 9 da marca **F**; 9 da marca **Y**; 9 da marca **Z**; 6 da marca **A** e 9 da marca **B**;
- 6 amostras de queijo Minas Padrão: 6 da marca **C**;
- 12 amostras de queijo Ricota Frescal: 9 da marca **V.A.** e 3 da marca **A**.

3.2 - Análise Microbiológica:

Foi utilizada a técnica Número Mais Provável (NMP) em série de 3 tubos nas diluições 10,0, 1,0 e 0,1 mL para a análise microbiológica do leite pasteurizado, como está descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (American Public Health Association, 1992) e Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA e JUNQUEIRA, 1995) . Três porções de 10 mL, de 1 mL de leite puro e 1 mL da diluição (10^{-1} em água peptonada 0,1%) foram semeadas em tubos, contendo 10 mL de Caldo lauril sulfato (Biobrás). As amostras de 10 mL foram semeadas no Caldo lauril sulfato 2x e as amostras de 1 mL e 10^{-1} mL foram semeadas em 10 mL de caldo lauril sulfato simples. Os tubos de cultura continham tubos de Durham. Os tubos foram incubados à 35° C por 48 horas. As amostras que apresentaram produção de gás após 48 horas foram semeadas em tubos contendo 7 ml de caldo

para cultivo de *Escherichia coli* (EC, Difco), com tubos de Durham, com o auxílio de uma alça de platina de 3 mm de diâmetro. Os tubos com o caldo EC foram incubados a 41° C em banho-maria por 24 horas. Foi utilizado essa temperatura porque, segundo a literatura, a *Escherichia coli* enterohemorrágica cresce até 43°C (MERMELSTEIN, 1993) e produz gás até 41°C (RAGHUBEER e MATCHES, 1990), por isso, não utilizamos a temperatura de 45,5° C que é a recomendada para a enumeração de coliformes fecais.

De cada amostra de manteiga pesou-se 25 g., acrescentou-se 225 mL de água peptonada 0,1%, incubou em banho-maria à 45,5° C/15 min. para ocorrer a separação entre a gordura e o soro. Para cada amostra de queijo também pesou-se 25 g., acrescentou-se 225 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizou com a ajuda do copo homogeneizador. Em seguida foram feitas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em tubos com 9 mL de água peptonada 0,1%. Foi inoculado 1 mL de cada diluição em 3 tubos contendo 7 mL de Caldo lauril sulfato (Biobrás), com tubos de Durham. Os tubos foram incubados à 35° C por 48 horas. As amostras que apresentaram produção de gás após 48 horas foram semeadas em tubos contendo 7 mL do caldo EC e tubos de Durham, com o auxílio de uma alça de platina de 3 mm de diâmetro. Os tubos com o caldo EC foram incubados à 41° C em banho-maria por 24 horas.

3.3 - Isolamento e Identificação:

Os tubos com o caldo EC positivos para a produção de gás foram semeados no ágar Mac Conkey por esgotamento e incubados à 35° C por 24 horas.

Foram escolhidas 3 colônias lactose positivas, lisas, circulares e convexas, de cada amostra semeada para a identificação bioquímica nos seguintes meios de cultura:

- meio EPM - analisa a produção de ácidos a partir da fermentação da glicose, a produção de gás, produção de H_2S , produção de urease e l-triptofano desaminase (TOLEDO *et al.*, 1982 a);
- meio MILI - analisa a motilidade, produção de lisina descarboxilase e indol (TOLEDO *et al.*, 1982 b);
- Citrato de Simons - analisa a utilização do citrato;

Foram identificadas como *Escherichia coli* as colônias que apresentaram produção ou não de gás, que foram negativas para a produção de H₂S, de urease e l-triptofano desaminase, que apresentaram ou não motilidade, positivas para a produção de lisina descarboxilase e indol e não utilizaram citrato.

Subseqüentemente, foram semeadas no meio Lignieres (250 mL caldo simples; 1,75 gr. ágar; 1,25 gr. gelatina) e armazenadas à temperatura ambiente. Foram também semeadas no meio BHI, incubadas à 37° C por 18 horas, após esse período foi acrescentado ao meio Hogness (6,3 gr. K₂HPO₄; 1,8 gr. KH₂PO₄; 0,45 gr. Citrato de Sódio; 0,9 gr. (NH₄)₂ SO₄; 0,09 gr. Mg SO₄ . 7 H₂O e 44 mL glicerol), na concentração de 1:1 e armazenadas nas temperaturas de -20° C e -80° C.

3.4 - Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

3.4.1 - Extração de DNA total das amostras de *Escherichia coli*:

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método descrito por Van Soolingen *et al.*, 1993.

As amostras de *E. coli* que estavam armazenadas na temperatura de -20° C foram semeadas no meio de cultura caldo LB e incubadas à 37°C, overnight. Após o crescimento as culturas bacterianas foram centrifugadas por 2 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 500µL de tampão T. E. 1 x (Tris, HCl, EDTA) 50 mM, pH 8,0, para lavar as células. As suspensões foram centrifugadas novamente por 2 minutos a 12.000 rpm, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 400µL de tampão T.E. Em seguida foram adicionados 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10µL de RNase (10 mg/mL), a mistura foi agitada em vortex, brevemente, e incubada a 37°C overnight.

No dia seguinte, foram adicionados 75 µL de SDS (“Sodium Duodecyl Sulfate”) a 10% com Proteinase K (10 mg/mL), pré-aquecidas à 65°C. Após agitação em vortex, brevemente, as amostras foram incubadas a 65° por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de

NaCl 5M e 100 μ L de solução CTAB (solução “Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide”)/NaCl (ambas pré-aquecidas a 65°C), a mistura foi agitada novamente em vortex, até que o líquido tornar-se branco (aspecto leitoso) e incubada a 65°C por mais 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 750 μ L de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após agitação em vortex, por pelo menos 10 segundos, a mistura foi centrifugada à temperatura ambiente (12.000 rpm/ 5 minutos). Após esta etapa, os sobrenadantes (~800 μ L), foram transferidos para tubos tipo “eppendorf” limpos usando-se uma micropipeta. Foram adicionados 450 μ L de isopropanol a cada amostra para precipitar o ácido nucleico. Os tubos foram agitados por inversão até a precipitação do ácido nucleico e, em seguida foram colocados a -20°C por 30 minutos.

Após este período, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente (12.000 rpm/5minutos), os sobrenadantes foram descartados, ao sedimento foram adicionados 1 mL de álcool etílico a 70 % e os tubos foram levados por 30 minutos ao freezer, -20° C. Em seguida, foram centrifugados à temperatura ambiente (12.000 rpm-/ 5 minutos) descartando-se os sobrenadantes. Os sedimentos foram deixados para secar em estufa a 37°C, até a completa evaporação do etanol evaporar. Por fim, o sedimento contendo o DNA foi redissolvido em 100 μ L de tampão T.E e armazenado a -20° C.

A concentração de DNA nas amostras foi determinada por espectrofotômetro no comprimento de onda $\lambda=260$, onde $[\text{DNA}] \mu\text{g/mL} = \lambda_{260} \times \text{diluição}(1:100) \times 50$. Para a verificação do grau de pureza das amostras foi utilizado o comprimento de onda $\lambda=280$ e a homogeneidade da preparação do DNA foi considerada adequada quando a relação $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ compreendia entre 1,8 e 1,9, que são os valores aceitáveis. Valores acima disso indicam a presença de RNA, abaixo disso indicam a presença de Proteína.

3.4.2 - Protocolos de Amplificação: A amplificação de DNA extraídos das amostras de *E. coli* foi realizada em termociclador (GENE AMP PCR SYSTEM 9.700,Perkim Elwer) em volume final de 50 μ L. A reação continha 5 μ L de “Buffer” PCR 10 X (200Mm Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), 0,4 mM de cada dNTP (10mM dNTP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 μ M de cada

(50mM MgCl₂) para ST-I e 3,5 mM de MgCl₂ (50mM MgCl₂) para LT-I, Stx1 e Stx2, 1 U de *Taq* DNA Polimerase (5U/μL) para ST-I e 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase (5U/μL) para LT-I, Stx1 e Stx2. Todos os reagentes e os iniciadores utilizados foram de procedência GIBCO BRL Products, Life Technologies. O volume final de 50 μL foi atingido pela adição de água quimicamente pura e estéril. A *Taq* DNA polimerase foi adicionada aos demais reagentes após ter ocorrido a desnaturação do DNA das amostras testadas a 94° C/ 10 min., quando a temperatura abaixou para 60° C.

Foram utilizadas as seguintes seqüências de nucleotídeos como iniciadores:

Gene	Iniciadores	Produto Final Pares de bases (pb)	Referências Bibliográficas
ST-I	5' TCC GTG AAA CAA CAT GAC GG 3' 5' ATA ACA TCC AGC ACA GGC AG 3'	244	OJENIYI <i>et al.</i> , 1994.
LT-I	5' GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC 3' 5' CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC 3'	696	BLANCO <i>et al.</i> , 1992; SCHULTSZ <i>et al.</i> , 1994.
Stx1	5' AGG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A 3' 5' TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G 3'	364	OJENIYI <i>et al.</i> , 1994.
Stx2	5' GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA 3' 5' GTA TCT GCC TGA AGC GTA A 3'	386	OJENIYI <i>et al.</i> , 1994.

Todas as reações de PCR foram realizadas com 25 ciclos de amplificação. As condições para a amplificação das diferentes toxinas estão citadas a seguir:

Ciclo para a amplificação de ST-I e LT-I:

- 94° C/30 segundos para a denaturação do DNA;
- 62° C/30 segundos para o anelamento;
- 72° C/30 segundos para a ampliação dos iniciadores anelados pela DNA polimerase.

Ciclo para a amplificação de Stx1 e Stx2:

- 94° C/ 2 minutos para a denaturação do DNA;
- 60° C/ 2 minutos para o anelamento dos primers;
- 72° C/ 2 minutos para a ampliação dos iniciadores anelados pela DNA polimerase.

A análise do produto final amplificado foi realizado em eletroforese em gel de agarose a 2%. Às amostras foram adicionados 5 µL do tampão de amostra (brometo de etídio) para 10 µL do produto amplificado e foram aplicados 5 a 10 µL dessa mistura na eletroforese (BLANCO *et al.*, 1997). Foi utilizado o padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pares de base da GIBCO BRL Products, Life Technologies.

IV - RESULTADOS

4.1. Leite Pasteurizado:

Das 105 amostras de leite pasteurizado analisadas, através da técnica Número Mais Provável (NMP), foram selecionadas 906 colônias para análise bioquímica, tendo sido identificadas como *Escherichia coli* 331 colônias (36,53%) (Tabela 01).

Foram analisadas 35 amostras de leite pasteurizado Tipo A das quais 6 (17,14%) foram positivas para *E. coli*, sendo isoladas 62 colônias; 35 amostras de leite pasteurizado Tipo B, tendo 21 (60%) amostras positivas para o microrganismo citado, isolando-se 236 colônias e 35 amostras de leite pasteurizado Tipo C das quais 6 (17,14%) foram positivas para *E. coli* com 33 colônias isoladas (Tabela 01 e Gráfico 01).

Em relação as marcas, foram pesquisadas 2 marcas diferentes de leite pasteurizado Tipo A, sendo 1 positiva para *E. coli*; foram analisadas 3 marcas diferentes de leite pasteurizado Tipo B sendo todas positivas para este microrganismo e foram examinadas 4 marcas diferentes de leite pasteurizado Tipo C das quais 2 foram positivas para *E. coli*.

Foi examinada a presença das enterotoxinas ST-I, ST-II e das citotoxinas Stx- 1 e Stx- 2 das 331 amostras de *E. coli* isoladas de leite pasteurizado. A presença das toxinas foi pesquisada através da técnica Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), utilizando-se iniciadores específicos para cada gene que codifica as toxinas citadas

Foram analisadas inicialmente as características genotípicas porque, segundo a literatura, células injuriadas resultantes da ação de agentes físicos ou químicos podem perder a habilidade genética de expressar os fatores de virulência (HILL, 1996). Foram utilizadas como controle amostras de *E. coli* positivas para os genes que codificam as toxinas já citadas (Figura 01).

As 331 amostras de *E. coli* isoladas de leite pasteurizado foram negativas para as enterotoxinas ST-I e LT-I e para as citotoxinas Stx1 e Stx2 (Tabela 01).

Tabela 01: Resultados obtidos no isolamento de *E. coli* de leite pasteurizado e na detecção das toxinas ST-I, LT-I, Stx1-I e Stx2.

Leite Pasteurizado	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>E. coli</i>	Nº de colônias positivas para <i>E. coli</i>	*Nº de colônias positivas para	
				ST-I	LT-I
				*Nº de colônias positivas para	
				Stx1	Stx2
Tipo A	35	6 (17%)	62	0	0
Tipo B	35	21 (60%)	236	0	0
Tipo C	35	6 (17%)	33	0	0
TOTAL	105	33 (31,4%)	331	0	0

* Foram analisadas os genes para as toxinas ST-I, LT-I, Stx- 1 e Stx- 2 através da técnica PCR.

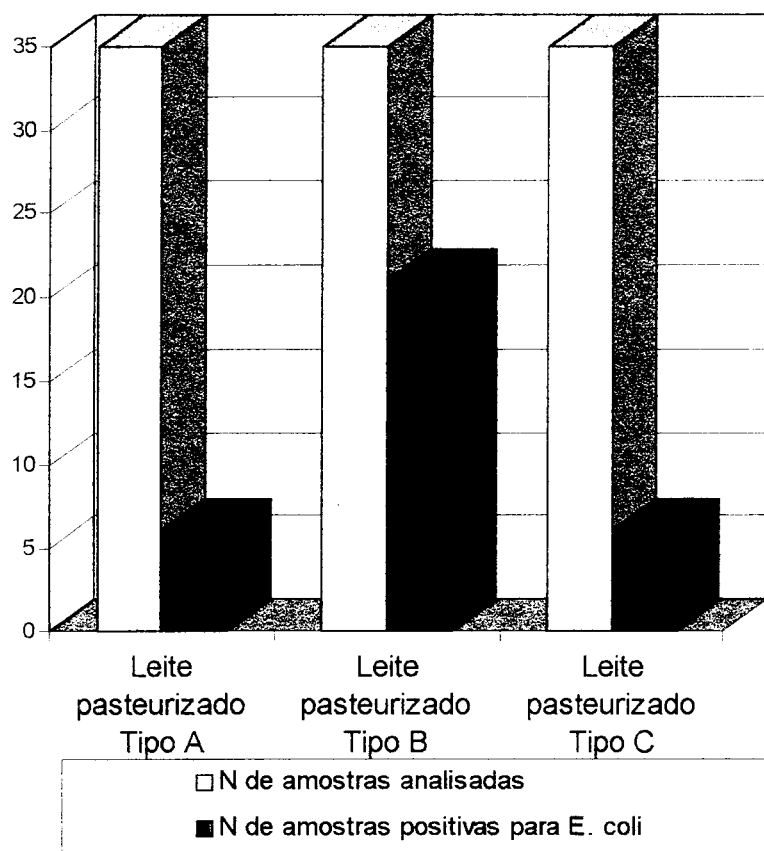


Gráfico 01: Número de amostras de leite pasteurizado analisadas e número de amostras positivas para *E. coli*.

4.2. Manteiga:

Foram pesquisadas 81 amostras de manteiga, através da técnica Número Mais Provável (NMP), sendo selecionadas 224 colônias para análise bioquímica das quais 21 (9,4%) foram identificadas como *Escherichia coli* (Tabela 02).

As cepas de *E. coli* foram isoladas de 3 amostras (20%) das 15 amostras de manteiga Comum analisadas e em 2 amostras (7,41%) das 27 amostras de manteiga de 1º Qualidade analisadas (Tabela 02 e Gráfico 02).

Das 3 marcas diferentes de manteiga Comum analisadas, 1 foi positiva para *E. coli*; das 3 marcas diferentes de manteiga de 1º Qualidade pesquisadas também somente 1 foi positiva para o microrganismo citado e das 7 marcas diferentes de manteiga Extra examinadas todas foram negativas para este microrganismo.

Foi pesquisada a presença dos genes codificadores das toxinas ST-I, LT-I, Stx- 1 e Stx- 2 das 21 amostras de *E. coli* isoladas de manteiga através do PCR. Foram utilizados como controle amostras de *E. coli* positivas para os genes que codificam as toxinas citadas (Figura 01).

As 21 amostras de *E. coli* foram negativas para as enterotoxinas ST-I e LT-I e para as citotoxinas Stx1 e Stx2 (Tabela 02).

Tabela 02: Resultados obtidos no isolamento de *E. coli* de manteiga e na detecção das toxinas ST-I, LT-I, Stx1 e Stx2.

Manteiga	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>E. coli</i>	Nº de colônias positivas para <i>E. coli</i>	*Nº de colônias positivas para		*Nº de colônias positivas para	
				ST-I	LT-I	SLT-I	SLT-II
Comum	15	3 (20%)	16	0	0	0	0
1º Qualidade	27	2 (7,41%)	5	0	0	0	0
Extra	39	0	0	0	0	0	0
TOTAL	81	5 (6,2%)	21	0	0	0	0

*** Foram analisadas os genes para as toxinas ST-I, LT-I, Stx- 1 e Stx- 2 através da técnica PCR.**

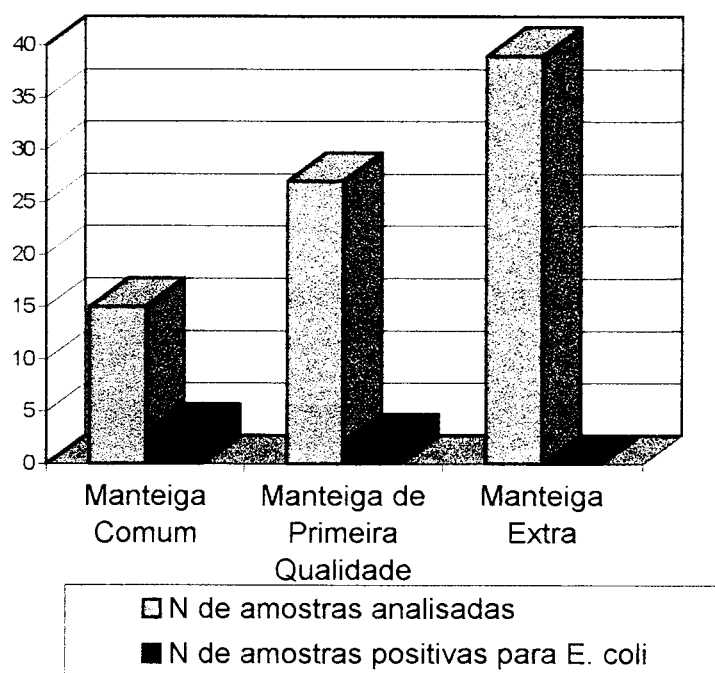


Gráfico 02: Número de amostras de manteiga analisadas e número de amostras positivas para *E. coli*.

4.3. Queijo:

Foram analisadas 81 amostras de queijo, através da técnica NMP, sendo selecionadas 651 colônias para a identificação bioquímica das quais 73 colônias (11,21%) foram identificadas como *Escherichia coli* (Tabela 03).

O microrganismo *E. coli* foi isolado de 17 amostras (27%) das 63 amostras de queijo Minas Frescal analisadas, em 1 amostra (17%) das 6 amostras de queijo Minas Padrão examinadas e em 2 amostras (17%) das 12 amostras de queijo Ricota Frescal pesquisadas (Tabela 03 e Gráfico 03).

Das 8 marcas diferentes de queijo Minas Frescal pesquisadas, 5 foram positivas para *E. coli*.

Foi analisado 1 marca do queijo Minas Padrão, o qual foi positivo para este microrganismo.

Em relação ao queijo Ricota Frescal, foram analisadas 2 marcas diferentes, ambas positivas para o microrganismo citado.

Foi analisada a presença dos genes que codificam as toxinas ST-I, LT-I, Stx- 1 e Stx- 2 através da técnica PCR das 73 amostras de *E. coli* isoladas de queijo. Foram utilizadas como controle amostras de *E. coli* positivas para os genes codificadores das toxinas citadas (Figura 01).

As 73 cepas de *E. coli* isoladas de queijo foram negativas para as toxinas ST-I, LT-I, Stx1 e Stx2 (Tabela 03).

Tabela 03: Resultados obtidos no isolamento de *E. coli* de queijo e na detecção das toxinas ST-I, LT-I, Stx1 e Stx2.

Queijo	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>E. coli</i>	Nº de colônias positivas para <i>E. coli</i>	*Nº de colônias positivas para		*Nº de colônias positivas para	
				ST-I	LT-I	SLT-I	SLT-II
Minas Frescal	63	17 (27%)	67	0	0	0	0
Minas Padrão	6	1 (17%)	2	0	0	0	0
Ricota Frescal	12	2 (17%)	4	0	0	0	0
TOTAL	81	20 (25%)	73	0	0	0	0

*** Foram analisadas os genes para as toxinas ST-I, LT-I, Stx- 1 e Stx- 2 através da técnica PCR.**

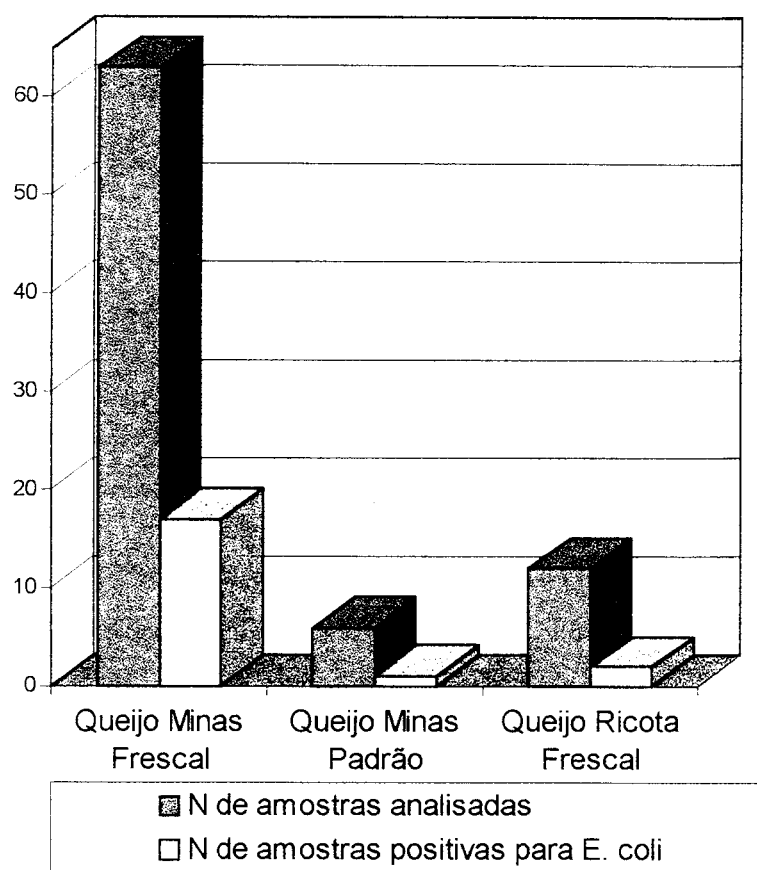


Gráfico 03: Número de amostras de queijo analisadas e número de amostras positivas para *E. coli*.

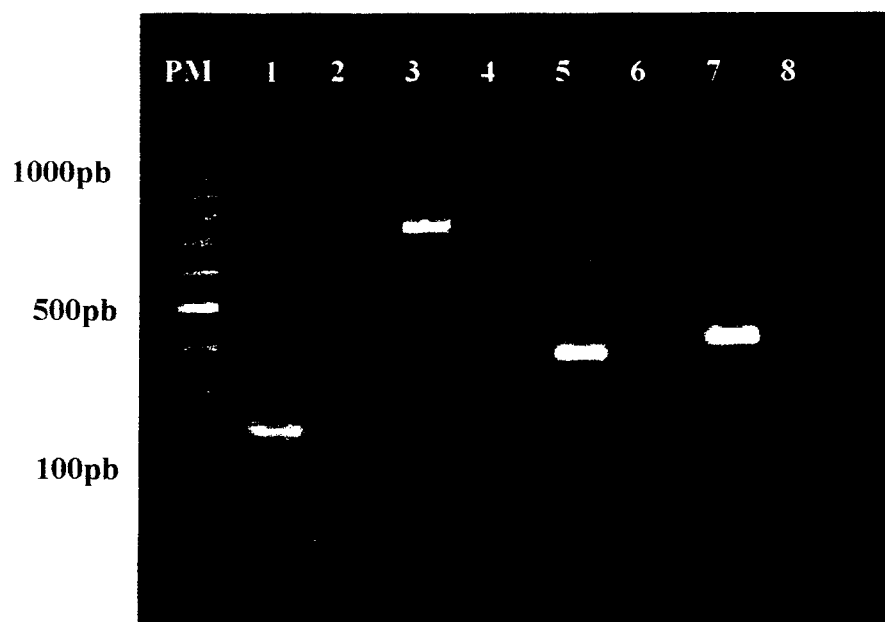


Figura 01: Perfil eletroforético dos produtos da reação de amplificação (PCR): **PM** - Padrão de Peso molecular DNA Ladder 100 pb; **1.** F82 (O101:K⁻) - controle positivo para ST-I; **2.** DH5 α - controle negativo; **3.** 40T - controle positivo para LT-I; **4.** DH5 α - controle negativo; **5.** O157:H7 - controle positivo para Stx1; **6.** DH5 α - controle negativo; **7.** O157:H7 - controle positivo para Stx2; **8.** DH5 α - controle negativo.

V - DISCUSSÃO

Neste trabalho procuramos avaliar a qualidade de alguns produtos lácteos, determinando a ocorrência de *E. coli* e uma vez identificada, verificamos se estas amostras possuíam genes relacionados a patogenicidade, o que poderia significar riscos aos consumidores finais de tais produtos.

Segundo Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 1997), a metodologia para a análise microbiológica deve obedecer, na ordem apresentada, o disposto pelo CODEX ALIMENTARIUS, pelo “International Commission on Microbiological Specifications Foods” (ICMSF), pelo “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (American Public Health Association, 1992) e pelo “Bacteriological Analytical Manual”. Assim, a metodologia determinada para a técnica do Número Mais Provável (NMP) para coliforme total, coliforme fecal e *E. coli* utiliza, normalmente, dois caldos de cultura. Essas três determinações são feitas em quatro etapas: 1ª - semeadura em caldo lauril sulfato, com incubação à 35° C por 24h e 48h (recuperação das células injuriadas); 2ª - semeadura das amostras positivas em caldo lauril sulfato para caldo bile lactose verde brilhante (determinação de coliformes totais), incubados à temperatura de 35° C por 48h ou para caldo EC (determinação de coliformes fecais e *E. coli*), com incubação a 45,5° C por 24h para alimentos e 44,5° C/ 24h para água; 3ª - plaqueamento das culturas positivas em meio sólido para isolamento de colônias de *E. coli*; 4ª - identificação de colônias através de testes adequados. Em nosso trabalho desenvolvemos todas as etapas citadas, exceto a determinação de coliformes totais e empregamos uma temperatura inferior à aquela utilizada para coliforme fecal, sendo usada a temperatura de 41° C. Essa alteração se deve ao fato de que o microrganismo *E. coli* O157:H7 cresce até 43° C e produz gás em caldo EC a 41° C (MERMELSTEIN, 1993; RAGHUBEER e MATCHES, 1990), portanto, não utilizamos nos nossos resultados o termo NMP de coliformes fecais e nem de NMP de coliformes totais.

De acordo com a legislação, Portaria N° 451 de 19 de setembro de 1997 (Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde), não é permitido a presença de Coliformes Fecais em 1 mL de amostra de leite pasteurizado tipo A pela técnica de Número Mais Provável

(NMP). As 6 amostras de leite pasteurizado tipo A analisadas foram positivas para *E. coli* dentre as 35 amostras pesquisadas. Uma vez que esse microrganismo faz parte do grupo Coliforme Fecal, deduz-se que essas amostras de leite pasteurizado tipo A não estavam de acordo com a legislação em relação ao número de coliformes fecais permitido.

Jakabi e Franco, em 1991 na cidade de São Paulo analisaram 96 amostras de alimentos de origem animal (32 amostras de leite pasteurizado), sendo todas positivas para *Escherichia coli*. As amostras de *E. coli* foram negativas para as toxinas ST-I e LT-I, Stx1 e Stx2.

Franco *et al.*, em 1991 na cidade de São Paulo pesquisaram a qualidade microbiológica de 96 amostras de alimentos de origem animal, sendo 32 amostras de leite pasteurizado. Foi detectado a presença de *E. coli* em todas as amostras de leite e dentre essas amostras, uma (3,1%) foi positiva para a toxina LT-II.

Em relação aos nossos resultados, das 105 amostras de leite pasteurizado analisadas, 33 amostras (31,4%) foram positivas para *E. coli*. A presença desse microrganismo sugere também a possível presença de outros microrganismos patogênicos, como *Salmonella*, *Shigella*, entre outros. A bactéria *E. coli* produtora de enterotoxinas ou de citotoxinas não foi detectada em nosso trabalho o que coincide com os resultados obtidos pelos pesquisadores citados acima.

Cooke *et al.*, em 1984 na Nova Zelândia analisaram 7.000 amostras de produtos de laticínios, incluindo manteiga, queijo, provenientes de leite pasteurizado, entre outros. O microrganismo *E. coli* foi detectado em 48 amostras de manteiga e em 35 amostras de queijo.

Abbar e Tahir Mohamed, em 1987 no Iraque pesquisaram a qualidade microbiológica de 30 amostras de manteiga e detectaram a ocorrência de *E. coli* em 12 amostras (41,1%). Das amostras identificadas como *E. coli*, foram isoladas 58 colônias, sendo que 3 (5,2%) foram positivas para ST-I.

Kulshrestha, em 1990 examinou a qualidade microbiológica de 169 amostras de produtos de laticínios, incluindo 15 amostras de queijo, 12 amostras de manteiga entre outros produtos. O microrganismo *E. coli* foi detectado em 6 amostras (40%) de queijo e em 1 amostra (8,3%) de manteiga. As *E. coli* isoladas do queijo pertenciam aos sorogrupos O18, O126 e O128 e as identificadas na manteiga pertenciam ao sorogrupo O128.

Nós detectamos o microrganismo *E. coli* em 5 amostras (6,2%) das 81 amostras de manteiga analisadas, contudo a determinação do sorogrupo nestas amostras não foi realizado. A porcentagem de amostras de manteiga positivas para *E. coli* de acordo com a literatura variou muito, apresentando resultados de 41,1%, segundo Abbar e Tahir Mohamed, 1987 a 8,3%, segundo Kushrestha, 1990. Os nossos resultados estão próximos aos resultados deste último. O elevado resultado obtido por Abbar e Tahir Mohamed, 1987 pode estar relacionado à vários fatores tais como uma pasteurização inadequada, contaminação após a pasteurização ou às condições de armazenamento inadequadas. A presença de *E. coli* produtora de enterotoxina e citotoxina não foi detectada em nossa pesquisa, sendo semelhante aos resultados apresentados nas pesquisas já citadas.

Glatz e Brudvig, em 1980 nos Estados Unidos analisaram 78 amostras de queijo das quais 22 amostras (28%) foram positivas para *E. coli*. As amostras de *E. coli* foram negativas para a produção de enterotoxina e citotoxina.

Tavares e Garcia, em 1993 no município de Blumenau, estado de Santa Catarina analisaram 20 amostras de queijo colonial preparadas com tecnologia desconhecida, adquiridas em feiras de comercialização de produtos coloniais. Foi detectado a presença de *E. coli* em 4 amostras (20%) de queijo colonial analisadas.

Garcia - Cruz *et al.*, em 1994 na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo pesquisaram 11 amostras de queijo Minas Frescal de produção artesanal e isolaram a bactéria *E. coli* em 9 amostras (81,8%) de queijo analisadas.

Calpe, em 1996 na Espanha pesquisou 23 amostras de queijo fresco. Dessas amostras, 20 (86,8%) ultrapassaram os valores estabelecidos pelas normas em relação ao número de microrganismos permitidos, distribuídos da seguinte forma: 11 amostras (47,8%) com enterobactérias, 7 amostras (30,4%) com enterobactérias e *E. coli*, 1 amostra (4,3%) com enterobactérias e *Staphylococcus aureus* e 1 amostra (4,3%) com *Listeria* spp.

Quinto e Cepeda, em 1997 na Espanha analisaram 73 amostras de queijo produzidos com leite pasteurizado e 221 amostras de queijo provenientes de leite cru. Observaram uma frequência de 0,4% (1 amostra) de *E. coli* enterotoxigênica e 0,4% (1 amostra) de “Shiga - toxin- producing” *E. coli* em queijo produzido com leite cru e frequência nula em queijo produzido com leite pasteurizado.

Ansary e Kaspar, em 1997 nos Estados Unidos verificaram a qualidade microbiológica de 69 amostras de queijo mole e semi-duro. Detectaram a presença de *E. coli* em 24 amostras (35%) de queijos moles e semi-duros tendo resultado negativo para a *E. coli* do sorotipo O157:H7.

Em nossos trabalhos, a bactéria *E. coli* foi detectada em 20 amostras (24,7%) de queijos das 81 amostras analisadas. Os nossos resultados são similares aos descritos na literatura (GLATZ e BRUDVIG, 1980; TAVARES e GARCIA, 1993 e ANSAY e KASPAR, 1997). Obtivemos frequência nula para *E. coli* enterotoxigênica e “Shiga - toxin- producing” *E. coli* sendo semelhante aos resultados apresentados por Quinto e Cepeda, 1997.

Os poucos trabalhos disponíveis no Brasil indicam baixa frequência de *E. coli* produtora de citotoxinas Stx em diarreia humana e em alimentos (GIRALDI *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1983).

Allmann *et al.*, em 1995 na Suíça analisaram 54 amostras de leite cru e 36 produtos de laticínios derivados de leite cru, totalizando 90 amostras de produtos lácteos. O microrganismo *E. coli* foi detectado através do PCR em 41 amostras (46%). Dessas 41 amostras, 11 amostras (27%) foram positivas para *E. coli* produtora da enterotoxina LT-I e 11 amostras (27%) foram positivas para *E. coli* produtora da enterotoxina ST-I. Dessas 22 amostras positivas, 4 amostras foram positivas para ambas toxinas. Através do PCR, também foram detectados o microrganismo *Listeria monocytogenes* em 12 amostras (13%) e o microrganismo *Campylobacter jejuni* ou *C. coli* em 6 amostras (7%). Nesse trabalho, esses pesquisadores também fizeram a análise microbiológica desses alimentos, utilizando a técnica dos meios de cultura específicos para cada microrganismo citado, comparando assim, a performance de cada método. Através da técnica dos meios de cultura o microrganismo *E. coli* foi detectado em 21 amostras das 90 amostras analisadas, enquanto que por PCR foi detectado em 41 amostras, a *Listeria monocytogenes* não foi analisada através desse método, os microrganismos *C. jejuni* e *C. coli* foram detectados em uma amostra de queijo.

Allmann *et al.*, 1995 chegaram a conclusão de que a análise de alimentos através do PCR além de ser rápida e versátil é mais específica que as técnicas que utilizam meios de cultura. Considerando o aumento na importância de doenças infecciosas, o PCR tem sido

considerado como o mais vantajoso no que tange a detecção de microrganismos potencialmente patogênicos aos consumidores.

Durante o processamento de alguns alimentos, os microrganismos presentes sofrem vários estresses químicos (ácido orgânicos ou inorgânicos, detergentes, sanitizantes, conservantes) ou físicos (baixa temperatura, calor, secagem, irradiação) podendo causar a morte (letal ou injúria irreversível), ou a injúria (morte subletal ou injúria reversível) (RAY, 1993). Células injuriadas são células que apresentam muitas estruturas e funções afetadas tais como lesão na parede celular, membrana citoplasmática, ribossomos, DNA e muitas enzimas (RAY, 1993). Assim, para haver a recuperação das células que encontram-se no estado de injúria reversível, é preciso escolher um método eficiente para que essas células recuperem suas funções e estruturas afetadas e comecem a se multiplicar para serem então detectadas. As células patogênicas injuriadas podem não ser detectadas pelos métodos que utilizam meios de cultura mas a injúria celular pode ser recuperada, havendo a multiplicação do microrganismo no alimento, causando um risco para a saúde pública (RAY, 1993).

A utilização de meios de cultura para detecção de microrganismos patogênicos pode ser deficiente quando a quantidade de microrganismo presente é elevada. Frank e Marth, 1978 relataram a ausência de *E. coli* patogênica em amostras de queijo mole e semi-duro, devido a grande quantidade de coliforme presente nas amostras. Esses autores sugerem que *E. coli* patogênica pode estar presente como uma pequena fração da população de coliforme, e poderia ter sido mascarada por esses microrganismos. Essa observação também foi citada por Neaves *et al.*, 1994.

O fato de termos obtidos resultados negativos para *E. coli* patogênica não garantem a segurança dos alimentos pelas seguintes razões:

- o subcultivo “in vitro” das amostras de *E. coli* isoladas poderia causar a perda dos genes das toxinas citadas uma vez que estes estão localizados em plasmídio;
- amostras de *E. coli* patogênicas poderiam ter estado presentes como uma pequena fração da população de *E. coli* em uma amostra de alimento particular, e poderiam ter sido mascaradas por outros microrganismos;
- que essas amostras de *E. coli* isoladas podem fazer parte de outro grupo patogênico de *Escherichia coli*;

- que outros fatores de virulência não analisados nesse trabalho podem estar presentes.

Em relação aos dois últimos itens mencionados acima podemos citar *Escherichia coli* como uma importante causa de mastite na espécie bovina. Foi a causa mais comum em 45.000 casos de mastite em 378 fêmeas bovinas no Reino Unido (SUSSMAN, 1997). Não tem sido possível distinguir amostras de *E. coli* que causam mastite das amostras da flora normal do trato gastrointestinal desses animais. Entre as 179 amostras de *E. coli* isoladas de bovinos com mastite, foram demonstrados 67 sorogrupos diferentes (SUSSMAN, 1997). Em relação aos fatores de virulência, a endotoxina é considerada de grande importância na resposta inflamatória e na toxemia que caracteriza a forma aguda dessa doença. Um segundo fator de virulência é a produção de toxinas citotóxicas, e têm sido associadas à necrose da camada superficial dos mamilos e seios lactíferos. *E. coli* produtora das toxinas “Cytotoxic Necrotising Factor” (CNF) tem sido isolada de casos de mastite bovina (SUSSMAN, 1997).

A pesquisa de *E. coli* associada a mastite não foi o objetivo deste trabalho, entretanto, a presença de *E. coli* produtora de CNF poderia supor que o estado de saúde do gado leiteiro não era satisfatório para a ordenha, o que sinaliza que novas pesquisas devem ser realizadas buscando verificar esta associação.

VI - CONCLUSÕES

- 1) A frequência de 31,4% de *E. coli* em leite pasteurizado indica que pode ter ocorrido contaminação após a pasteurização ou que a pasteurização foi deficiente, uma vez que esse microrganismo é sensível a pasteurização.
- 2) O isolamento de *E. coli* em manteiga (6,2%) e em queijo (24,7%), sugere que as condições de higiene do ambiente, utensílios e pessoal durante a produção desses produtos foram inadequadas ou que a matéria - prima já estava contaminada devido aos fatores apresentados no item anterior.
- 3) Os resultados obtidos demonstram que, apesar da legislação e da fiscalização, a linha de produção dos produtos de laticínios necessitam de práticas sanitárias mais eficientes, para eliminar as possíveis vias de transmissão.

ABSTRACT

The fecal coliform group is restricted to organisms that grow in the gastrointestinal tract of humans and warm-blooded animals. It includes members of at least three genera: *Escherichia*, *Klebsiella*, and *Enterobacter*. *E. coli* is considered as an index of fecal pollution. Therefore the presence of this microorganism in food indicates that food has been drawn under unsatisfactory hygienic conditions.

The purpose of this study was to research the presence two groups of diarrheal *E. coli*: Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) from dairy products.

The dairy products (pasteurized milk, butter and cheese) were collected from Monte Mor, Campinas e Bragança Paulista. A total of 105 samples of pasteurized milk types “A”, “B” e “C” were analysed. Thirty and three (31,4%) of these samples contained *E. coli*. Five (6,2%) of 81 samples of butter tested positive for *E. coli*. Twenty (25%) of 81 samples of cheese examined were positive for *E. coli*. The presence of *E. coli* in dairy products may be due inadequate pasteurization, because the adequate pasteurization kill this microorganism, ou postprocess contamination.

This survey demonstrates that dairy products require that sanitation practices be carefully monitored and improved to eliminate routes of contamination.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABAAS, S.; FRANKLIN, A.; KUHN, I.; ØRSKOV, F. and ØRSKOV, I. (1989). Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. **Am. J. Vet. Res.** **50**: 1294-1296.
2. ABBAR, F. M. and TAHIR MOHAMED, M. (1987). Occurrence of enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes in butter. **J. Food Protect.** **50**: 829-831.
3. ADAK, G.; SMITH, H.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T.; WALL, P. and ROWE, B. (1997). A review of outbreaks of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales 1992-1996. Abstr. V75/I, p. 10. In 3rd international Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, N. Y.
4. ALLMANN, M.; HOFELIN, C.; KOPPEL, E.; LUTHY, J.; MEYER, R.; NIEDERTHAUSER, C.; WEGMULLER, B. and CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. **Institut Pasteur**, **146**: 85-97,
5. ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H. and POTTER, M. E. (1998). Cheese-associated outbreaks of human illness in the united states, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **J. Food. Protect.** **61**: 1405-1407.
6. American Public Health Association, **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3° ed., Washington, 1992. pp. 01-1219.

7. ANSAY, S., E. and KASPAR, C., W. (1997). Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. **Lett. Appl. Microbiol.** **25**: 131-134.

8. BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S. and SCHEUTZ, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 2483-1488.

9. BLANCO, J.; GONZÁLES, E., A.; ESPINOSA, P.; BLANCO, M.; GARABAL, J., I. and ALONSO, M., P. (1992). Enterotoxigenic and necrotizing *E. coli* in human diarrhoea in Spain. **European J. Epidem.** **8**: 548-552.

10. BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALES, E. A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T. A. T.; ZERBINI, L. F.; YANO, T.; CASTRO, A. F. P and BLANCO, J. (1997). Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belongin to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 2958-2963.

11. BOER, E.(1998). Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. **Intern. J. Food Microbiol.** **45**: 43-53.

12. CALDERWOOD, S., B.; ACHESON, D., W., D.; KEUSCH, G., T.; BARRETT, T., J.; GRIFFIN, P., M.; STROCKBINE, N., A.; SWAMINATHAN, B.; KAPER, J., B.; LEVINE, M., M.; KAPLAN, B., S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A., D.; OBRIG, T., G.; TAKEDA, Y.; TARR, P., I. and WACHSMUTH, I., K. (1996). Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News**, **62**: 118-119.

13. CALDERWOOD, S. B.; AUCLAIR, F.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G. T. and MEKALANOS, J. J. (1987). Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 4364-4368.

14. CALPE, C. M. (1996). Calidad microbiologica de quesos: importancia de una buena manipulacion. **Aliment.** **270**: 69-72.

15. CAPRIOLI, A.; NIGRELLI, A.; GATTI, R.; ZAVANELLA, M.; BLANDO, A. M.; MINELLI, F. and DONELLI, G. (1993). Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. **Vet. Rec.** **133**: 323-324.

16. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (1995 a). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami - Washington and California, 1994. **Morbid. Mortal. Weekly Rep.** **44**: 157-160.

17. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (1995 b). Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 - Helena, Montana, 1994. **Morbid. Mortal. Weekly Rep.** **44**: 501-503.

18. CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A. and GUTH, B. E. C. (1997). High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **J. Food Protect.** **60**: 177-180.

19. CLARKE, R. C.; WILSON, J. B.; READ, S. C.; RENWICK, S.; RAHN, K.; JOHNSON, R. P.; ALVES, D.; KARMALI, M. A.; LIOR, H.; McEWEN, S. A.; SPIKA, J. and GYLES, C. L. (1994). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain: preharvest and processing perspectives, p. 17-24. In M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.). Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.

20. COOKE, B. C.; EDWARDS, S. M.; GLEESON, T. W. and THOMSON, A. (1984). A comparison of the IMViCE series with conventional methods for the confirmation of *Escherichia coli* in dairy products. **Australian J. Dairy Tech.** **39**: 83-84.

21. CRAY, W. C. and MOON, H. W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**: 1586-1590.

22. CULLOR, J. S. (1997). HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points): Is it coming to the dairy? *J. Dairy Sci.* **80**: 3449-3452.

23. DEAN-NYSTROM, E. A.; BOSWORTH, B. T.; CRAY Jr, W. C.. and MOON, H. W. (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. **Infect. Immun.** **65**: 1842-1848.

24. de GRAAF, F. K. and ROORDA, I. (1982). Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F 41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strains B 41 M. **Infect. Immun.** **36**: 751-753.

25. DeGRANDIS, S.; GINSBERG, J.; TOONE, M.; CLIMIE, S.; FRIESEN, J. and BRUNTON, J. (1987). Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. **J. Bacteriol.** **169**: 4313-4319.

26. DeGRANDIS, S.; LAW, H.; BRUNTON, J.; CYLES, C. and LINGWOOD, C. A. (1989). Globotetraosyl ceramide is recognized by the pig edema disease toxin. **J. Bio. Chem.** **264**: 12520-12525.

27. DENG, M. Y.; CLIVER, D. O.; DAY, S. P. and FRATAMICO, P. M. (1996). Enterotoxigenic *Escherichia coli* detected in foods by PCR and an enzyme-linked oligonucleotide probe. **Intern. J. Food Microbiol.**, **30** : 217-229.

28. DORN, C. R.; DVM.; MPH. (1995). *Escherichia coli* O157:H7. **JAVMA**, **206**: 1583-1585.
29. DOYLE, M., P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **Intern. J. Food Microbiol.**, **12**: 289-302.
30. DUNCAN, S. E. and HACKNEY, C. R. (1994) Relevance of *Escherichia coli*. O157:H7 to the dairy industry. **Food and Environ. Sanit.** **14**: 656-660.
31. DUPONT, H. L.; FORMAL, S. B.; HORNICK, R. B.; SNYDER, M. J.; LIBONATI, J. P.; SHEEHAN, D. G.; LABREC, E. H. and KALAS, J. P. (1971). Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **New Engl. J. Med.** **285**: 1-9.
32. ENDO, Y.; TSURUGI, K.; YUTSUDO, T.; TAKEDA, Y.; OGASAWARA, T. and IGARASHI, K. (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxin. **Eur. J. Biochem.** **171**: 335-337.
33. EVANS, D. G. and EVANS, D. J. (1978). New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of sorogroups O6 and O8. **Infect. Immun.** **21**: 638-647.
34. FAIRBROTHER, J. M.; LARIVIERE, S. and LALLIER, R. (1986). New fimbrial antigen F 165 from *Escherichia coli* sorogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infect. Immun.** **51**: 10-15.
35. FRANCO, B., D., G., M.; GOMES, T., A., T.; JAKABI, M. and MARQUES, L., R., M. (1991). Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods. **Int. J. Food. Microbiol.** **12**: 333-338.

36. FRANCO, B., D., G., M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo-SP, 1996.
37. FRANK, J., F. and MARTH, E., H. (1978). Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *E. coli*. **J. Food Protect.**, **41**, 198-200.
38. GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMANN, F. L. and VINTURIM, T. M. (1994). Estudo microbiológico de queijo tipo minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto - S. P. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **54**: 78-82.
39. GIRALDI, R.; GUTH, B., E., C. and TRABULSI, L., R. (1990). Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** **28**: 1460-1462.
40. GLATZ, B. A. and BRUDVIG, S. A. (1980). Survey of commercially available cheese for enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Food Protect.** **43**: 395-398.
41. GLYNN, K.; CODY, S.; CAIRNS, L.; ALEXANDER R.; FYFE, M.; SAMADPOUR, M.; LEWIS, J.; SWAMINATHAN, B.; ABBOTT, S.; HOFFMAN, R.; KOBAYASHI, J.; VUGIA, D. and GRIFFIN, P. (1997). International outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with unpasteurized commercial apple juice, abstr. V147/I, p. 18. In 3rd International symposium and workshop on Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* infections. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Ins., Melville, N. Y.

42. GOLDWATER, P. N. and BETTELHEIM, K. A. (1994). The role of enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes other than O157:H7 as causes of disease, p. 57-60. In M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B. V., Amsterdam. The Netherlands.
43. GOLDWATER, P. N. and BETTELHEIM, K. A. (1998). New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. **J. Med. Microbiol.** **47**: 1039-1045.
44. GORBACH, S. L.; KEAN, B. H.; EVANS, D. G.; EVANS, D. J. and BESSUDO, D. (1975). Travellers' diarrhoea and toxigenic *Escherichia coli*. **New Engl. J. Med.**, **292**: 933-936.
45. GRIF, K.; DIERICH, M. P. and ALLERBERGER, F. (1998). Dynabeads™ plus 3 M Petrifilm HEC™ versus Vitek Immunodiagnostic Assay System™ for detection of *E. coli* O157 in minced meat. **Lett. Appl. Microbiol.**, **26**: 199-204.
46. GRIFFIN, P. M. and TAUXE, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.** **13**: 60-98.
47. GUERRANT, R. L.; MOORE, R.A.; KIRSCHENFOLD, B. A. and SANDE, M. A. (1975). Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhoea of childhood. **New Engl. J. Med.**, **293**: 567-573.
48. GUNZER, F.; BOHM, H.; RUSSMANN, H.; BITZAN, M.; ALEKSIC, S. and KARCH, H. (1992). Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.** **30**: 1807-1810.

49. GYLES, C. L. (1992). *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can. J. Microbiol.** **38**: 734-746.
50. GYLES, C. L.; De GRANDIS, S. A.; MacKENZIE, C. and BRUNTON, J. L. (1988). Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin producing in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.** **5**: 419-426.
51. HALL, H. E.; BROWN, D. F. and LEWIS, K. H. (1967). Examination of market foods for coliform organisms. **App. Microbiol.** **15**: 1062-1069.
52. HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J. and GYLES, C. (1995). Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can. J. Vet. Res.** **59**: 265-270.
53. HILL, W., E. (1996). The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. **Crit. Rev. Food Sc. Nut.** **36**: 123-173.
54. HOBBS, B. C.; ROWE, B.; KENDALL, M.; TURNBULL, P. C. B. and GHOSH, A. C. (1976). *Escherichia coli* O27 in adult diarrhoea. **J. Hyg., Cambridge**, **77**: 393-400.
55. HONDA, T.; ARITA, M and MIWATANI, T. (1984). Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli* : a new colonization factor. **Infect. Immun.** **43**: 959-965.
56. HOVDE, C. J.; CALDERWOOD, S. B.; MEKALANOS, J. J. and COLLIER, R. J. (1988). Evidence that glutamic acid 167 is an active site residue of Shiga-like toxin. **I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**: 2568-2572.

57. HULIAN, S.; ZHEN, L. G. and MATHAN, M. M. (1991). Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentric study in five countries. **Bul. World Health Organ.** **69**: 549-555.

58. IMBERECHTS, H.; de GREVE, H. and LINTERMANS, P. (1992). The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. **Vet. Microbiol.** **31**: 221-233.

59. JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. and NEWLAND, J. W. (1987 a). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol. Lett.** **44**: 109-114.

60. JACKSON, M. P.; NEWLAND, J. W.; HOLMES, R. K. and O'BRIEN, A. D. (1987 b). Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.** **2**: 147-153.

61. JAKABI, M. and FRANCO, B. D. G. M. (1991). Frequência de isolamento de cepas de *Escherichia coli* patogênica em alimentos de origem animal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** **11**: 170-181.

62. KARCH, H.; MEYER, T.; RUSSMANN, H. and HEESEMANN, J. (1992). Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. **Infect. Immun.** **60**: 3464-3467.

63. KARCH, H.; RUSSMANN, H.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A. and HEESEMANN, J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in diarrheal diseases. **J. Clin. Microbiol.** **33**: 1602-1605.

64. KARMALI, M., A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *E. coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, **2**, 15-38.
65. KEENE, W. E.; SAZIE, E.; KOK, J.; RICE, D. H.; HANCOCK, D. D.; BALAN, V. K.; ZHAO, T. and DOYLE, M. P. (1997). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. **JAMA** **277**: 1229-1231.
66. KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I. and STAVRIC, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **18**: 775-779.
67. KOZLOV, Y. V.; KABISHEV, A. A.; LUKYANOV, E. V. and BAYEV, A. A. (1988). The primary structure of the operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperate phage H30 Shiga-like toxin. **Gene** **67**: 213-221.
68. KUDVA, I. T.; HATFIELD, P. G. and HOVDE, C. J. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. **J. Clin. Microbiol.** **34**: 431-433.
69. KUDVA, I., T.; HATFIELD, P., G. and HOVDE, C., J. (1997). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. **J. Clin. Microbiol.** **35**: 892-899.
70. KULSHRESTHA, S. B. (1990). Prevalence of enteropathogenic serogroups of *E. coli* in milk products samples from Bareilly and their multiple drug resistance. **Indian J. Dairy Sci.**, **43**: 373-378.
71. LERAYER, A. L. S.; CARVALHO, A. F.; BUCIONE, A.; KESTENER, B. M. A. C.; MOSQUIM, M. C. A.; NUTTI, M. R. and FILHO, P. S. (Comentaristas). **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light e enriquecidos**. Editora Fonte Comunicações, São Paulo - S. P. 1998.

72. LEVINE, M. M.; CAPLAN, E. S.; WATERMAN, D.; CASH, R. A.; HORNICK, R. B. and SNYDER, M. J. (1977). Diarrhoea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.**, **17**: 78-82.

73. LIOR, H. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 and verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environ. Sanit.** **14**: 378-382.

74. MASSA, S.; ALTIERI, C.; QUARANTA, V. and De PACE, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4° C. **Lett. Appl. Microbiol.** **24**: 347-350.

75. MARQUES, I. R. M.; PEIRIS, J. S. M.; CRYZ, S. J. and O'BRIEN, A. D. (1987). *Escherichia coli* strains isolated from pigs produce a variant of Shiga-like toxin II. **FEMS Microbiol. Lett.** **44**: 33-38.

76. MERMELSTEIN, N., H. (1993). Controlling *E. coli* O157:H7 in meat. **Food Technol** **47**: 90.

77. MERSON, M. H.; MORRES, G. K.; SACK, D. A.; WELLS, T. G.; FEELEY, J. C.; SACK, R. B.; CREECH, W. B.; KAPIKIAN, A. Z. and GANGAROSA, E. J. (1976). Travellers' diarrhoea in Mexico. **New England J. Med.** **194**: 1299-1305.

78. MINISTERIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 146 de 07/março/1996. **Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. D.O.U. de 11/03/96, Brasília.

79. MITSUDA, T.; MUTO, T.; YAMADA, M.; KOBAYASHI, N.; TOBA, M.; AIHARA, Y.; ITO, A. and YOKOTA, S. (1998). Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic dna analysis. **J. Clin. Microbiol.** **36**: 652-656.

80. MOLEND, J. R. (1994). *Escherichia coli* (including o 157:h7): an environmental health perspective. **Dairy, Food and Environ. Sanit.** **14**: 742-747.
81. MORGAN, D.; NEWMAN, C. P.; HUTCHINSON, D. N.; WALKER, A. M.; ROWE, B. and MAJID, F. (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yoghurt. **Epidemiol. Infect.** **111**: 181-187.
82. MORRIS, J. A. and SOJKA, W. J. (1985). *Escherichia coli* as a pathogen in animals, p. 47-77. In M. Sussman (ed.), The virulence of *Escherichia coli*. Society for General Microbiology and Academic Press. Ltd., London, United Kingdom.
83. NALIN, D. R.; McLAUGHLIN, J. C.; RAHAMAN, M.; YUNUS, M. and CURLIN. G. (1975). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and idiopathic diarrhoea in Bangladesh. **Lancet**, **2**: 1116-1119.
84. NAGY, B.; MOON, H. W. and ISAACSON, R. E. (1976). Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigens and by some acapsular mutants. **Infect. Immun.** **13**: 1214-1220.
85. NEAVES, P.; DEACON, J. and BELL, C. (1994). A survey of the incidence of *E. coli* O157 in the UK dairy industry. **Intern. Dairy J.** **4**, 679-696.
86. NIELSEN, N. O. and CLUGSTON, R. E. (1971). Comparison of *E. coli* endotoxin shock and acute experimental edema disease in young pigs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **176**: 176-189.
87. NYE, F. J. (1979). Travellers' diarrhoea. **Clinics in Gastroenterology**, **8**: 767-781.

88. O'BRIEN, A. D. and HOLMES, R. K. (1987). Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.** **51**: 206-220.
89. O'BRIEN, A. D.; NEWLAND, J. W.; MILLER, S. F.; HOLMES, R. K.; SMITH, H. W. and FORMAL S. B. (1984). Shiga-like toxin-converting phage from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis ou infantile diarrhea. **Science** **226**: 694-696.
90. OJENIYI, B.; AHRENS, P. and MEYLING, A. (1994). Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. **J. Vet. Med.** **41**: 49-59.
91. OKAMOTO, K.; FUJII, Y.; AKASHI, N.; HITOTSUBASHI, S.; KURAZONO, H.; KARASAWA, T. and TAKEDA, Y. (1993). Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II - producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. **Microbiol. Immun.** **37**: 411-414.
92. OKREND, A., J., G.; ROSE, B., E. and BENNETT, B. (1990). A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **J. Food Protect.**, **53**: 249-252.
93. OMBUI, J. N.; DABURIA, H. F. A. MACHARIA, J. K. and NDUHIU, G. (1994). Coliform counts and *Escherichia coli* in raw commercial milk from dairy farmers in kiambu district, kenya. **East African Med. J.** **71**: 635-639.
94. ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H. W. and SOJKA, W. J. (1975) The establishment of K99, a thermo-labile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.** **83**: 31-36.

95. ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SOJKA, W. J. and WITTING, W. (1964) K antigens K88 (L) and K88 (L) and K88 (L) in *Escherichia coli*. A new O antigen : O 147 and a new K antigen : K88 (B). **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.** **62**: 439-477.
96. PADHYE, N., V. and DOYLE, M., P. (1991 a). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O126:H11. **J. Clin. Microbiol.** **29**: 99 - 103.
97. PADHYE, N., V. and DOYLE, M., P. (1991 b). Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 2693-2698.
98. PATON, J., C. and PATON, A., W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.** **11**: 450-479.
99. PATON, A. W.; RATCLIFF, R.; DOYLE, R. M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANSER, J. A. and PATON, J. C. (1996). Molecular microbiological investigations of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** **34**: 1622-1627.
100. PIERARD, D., STEVENS, D.; MORIAU, L.; LIOR, H. and LAUWERS, S. (1994). Three years PCR screening for VTEC in human stools in Brussels, p. 33-36. *In* M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.). Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B. V., Amsterdam. The Netherlands.
101. PIRRO, F.; WIELER, L. H.; FAILING, K.; BAUERFEIND, R. and BALJER, G. (1995). Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle. **Vet. Microbiol.** **43**: 131-141.

102. PRATA, L. F. **Tópicos avançados de leite e derivados**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, Unesp - S. P., 1996.
103. QUINTO, E. J. and CEPEDA, A. (1997). Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw ou pasteurized milk. **Lett. Appl. Microbiol.** **24**: 291-295.
104. RAGHUBEER, E., V. and MATCHES, J., R. (1990). Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. **J. Clin. Microbiol.** **28**: 803-805.
105. RAY, B. (1993). Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **ASM News**, **59**: 285-291.
106. REED, G. H., (1994) Foodborne illnes (Part 8) *Escherichia coli*, **Dairy, Food and Environ. Sanit.**, **14**: 329-330.
107. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/52. Alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25/06/62.
108. REIDA, P.; WOLFF, M.; POHLS, H. W.; KUHLMANN, W.; LEHMACHER, A.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. and BOCKEMUHL, J. (1994). An outbreak due to enterohaermorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. **Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.** **281**: 534-543.
109. RICCI, L. C.; FARIA, F. P.; PORTO, P. S. S.; OLIVEIRA, E. M. G. and PESTANA de CASTRO, A. F. (1997). A new fimbrial putative colonization factor (PCF02) in human enterotoxigenic *Escherichica coli* isolated in Brazil. **Res. Microbiol.**, **148**: 65-69.

110. ROSENBERG, M. L.; KOPLAN, J. P.; WACHSMUTH, J. K.; WELLS, J. G.; GANGAROSA, E. J.; GUERRANT, R. L. and SACK, D. A. (1977). Epidemic diarrhoea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Ann. Internal Med.**, **86**: 711-718.
111. SACK, D. A.; KAMINSKY, D. C.; SACK, R. B.; WAMOLA, I. A.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; SLACK, R. C. B.; ARTHUR, R. R. and KAPIKIAN, A. Z. (1977 a). Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in travellers: a prospective study of American Peace Corps volunteers. **Johns Hopkins Med. J.** **141**: 63-70.
112. SACK, D. A.; McLAUGHLIN, J. C.; SACK, R. B.; ØRSKOV, F. and ØRSKOV, I. (1977 b). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients at a hospital in Dacca. **J. Infect. Dis.**, **135**: 275-280.
113. SALYERS, A. A. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. A. S. M. Pres, Washington, D. C. Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana Illinois, 1994. pp. 191-203.
114. SAMUEL, J. E.; PERERA, L. P.; WARD, S.; O'BRIEN, A. D.; GINSBURG, V. and KRIVAN, H. C. (1990). Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. **Infect. Immun.** **58**: 611-618.
115. SANDVIG, K.; GARRED, O.; PRYDZ, K.; KOZLOV, J. V.; HANSEN, S. H. and van DEURS, B. (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. **Nature** **358**: 510-512.

116. SANDVIG, K.; RYD, M.; GARRED, O.; SCHWEDA, E.; HOLM, P. K. and van DEURS, B. (1994). Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. **J. Cell Biol.** **126**: 53-64.
117. SANDVIG, K. and van DEURS, B. (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. **Physiol. Rev.** **76**: 949-966.
118. SAXENA, S. A.; O'BRIEN, A. D. and ACKERMAN, E. J. (1989). Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28S RNA when microinjected into *Xenopus oocytes*. **J. Biol. Chem.** **264**: 596-601.
119. SCHOONDERWOERD, M.; CLARKE, R. C.; van DREUMEL, A. A. and RAWLUK, S. A. (1988). Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strains of *Escherichia coli* O111:NM. **Can. J. Vet. Res.** **52**: 484-487.
120. SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; vanKETEL, R.; WEVEK, B. SPEELMAN, PL and DANKERT, J. (1994). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.** **32**: 2393-2397.
121. SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; WILLSHAW, G. A. and ROWE, B. (1983). Verocytotoxin production in strains of *Escherichi coli* is determined by genes carried on bacteriophage. **Lancet ii**: 216.
122. SEARS, C. L. and KAPER, J. B. (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, **60**: 167-215.
123. Secretaria de Inspeção de Produto Animal do Ministério da Agricultura. Portaria nº 17 de 29/10/84. Normas Técnicas e Higiénico Sanitário para a produçã de leite Tipo A.

124. Secretaria de Inspeção de Produto Animal do Ministério da Agricultura. Portaria nº 08 de 26/06/84. Normas Técnicas e Higienico Sanitário para a produção de leite Tipo B.
125. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 451 de 19/09/97. Regulamento Técnico, Princípios Gerais para o estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológico para Alimentos.
126. SHORE, E. G.; DEAN, A. G.; HONK, K. J. and DAVIS, B. R. (1974). Enterotoxin-producing *Escherichia coli* and diarrhoeal disease in adult travellers: a prospective study. **J. Infect. Dis.** **129**: 577 - 82.
127. SILVA, M., L., M.; SCALETSKY, I., C., A. and VIOTTO, L. H. (1983). Non production of cytotoxin among enteropathogenic strains of *Escherichia coli* isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.** **14**: 161-162.
128. SILVA, N. and JUNQUEIRA, V., C., A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária, 1995.
129. SKINEER, L. M. and JACKSON, M. P. (1997). Investigation of ribosome binding by the Shiga toxin A1 subunit, using competition and site-directed mutagenesis. **J. Bacteriol.** **179**: 1368-1374.
130. SMITH, H. R.; DAY, N. P.; SCOTLAND, S. M.; GROSS, R. J. and ROWE, B. (1984). Phage-determined productin of vero cytotoxin in strains of *Escherichia coli* serogroup O157. **Lancet i**: 1242-1243.
131. SMITH, H. R. and SCOTLAND, S. M. (1988). Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.** **26**: 77-85.

132. STROCKBINE, N. A.; JACKSON, M. P.; SUNG, L. M.; HOLMES, R. K. and O'BRIEN, A. D. (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. **J. Bacteriol.** **170**: 1116-1122.

133. SUSSMAN, M. *Escherichia coli, mechanisms of virulence*. Cambridge University Press - USA, 1997.

134. TAVARES, L., B., B. e GARCIA, J., A. (1993). Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo colonial comercializado no município de Blumenau, Estado de Santa Catarina. **B. CEPPA**, **11**: 139-146.

135. THOMAS, L.V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S. M. and ROWE, B. (1982). New fimbrial antigen type (E8775) that may represent a colonization factor in *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immun.** **35**: 1119-1124.

136. TODD, W. C. D. (1997). Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. **Rapp. Trimest. Statist. Sanit. Mond.**, **50**: 30-50.

137. TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; and TRABULSI, L. R. (1982 a) Modificação do meio de Rugai e Araujo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, HS, urease e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.** **13**: 309-315.

138. TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F. and TRABULSI, L. R. (1982 b). Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.** **13**: 230-235.

139. TSCHAPE, H.; PRAGER, R.; STRECKEL, W.; FRUTH, A. and BOHME, G. (1994). Outbreak of cases of hemolytic uremic syndromes and gastroenteritis in a nursery school - verotoxinogenic *Citrobacter freundii* as a causative agent, abstr. O1.8, p. 22. In VTEC'94: 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga-Like Toxin)- Producing *Escherichia coli* infections. Italian Association of Clinical Microbiologists, Milan.

140. VAN SOOLINGER, D.; HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P. M. A. and VAN EMBDEN, J. D. A. (1993). Comparion of varios repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 1987-1995.

141. VESSONI PENHA, T., C.; BARUFFALDEI, R.; COLOMBO, A., J. (1986). Estudo das condições higiênico - sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado, teor de gordura 3,2% m/v., vendido na cidade de São Paulo. **Boletim SBCTA**, **6**: 57-74.

142. VIBOUD, G.I.; BINSZTEIN, N. and SVENNERHOLM, A. M. (1993). A new fimbrial putative colonization factor, PCFO20, in human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **61**: 5190-5197.

143. WADSTROM, T.; AUST-KELTIS, A.; HABTE, D.; HOLMGREN, J.; MEEUWISSE, G.; MOLLBY, R. and SODERLIND, D. (1976). Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease. **Arch. Dis. Child.** **51**: 865-870.

144. WEINSTEIN, D. L.; JACKSON, M. P.; PERERA, L. P.; HOLMES, R. K. and O'BRIEN, A. D. (1989). The *in vivo* formation of hybrid toxins comprised of Shiga toxin and the Shiga-like toxins and the role of the B subunit in localization and cytotoxic activity. **Infect. Immun.** **57**: 3743-3750.

145. WEINSTEIN, D. L.; JACKSON, M. P.; SAMUEL, J. E.; HOLMES, R. K. and O'BRIEN, A. D. (1988). Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. **J. Bacteriol.** **170**: 4223-4230.

146. World Health Organization, 45 th World Health Assembly (1992). **Implementation of the global strategy for all by year 2000**. Second evolution, and eighth report of the World Health Situation. Geneva: WHO, 145/3.

147. WRAY, C.; RANDALL, L. P.; McLAREN, I. M. and WOODWARD, M. J. (1994). Verocytotoxic *Escherichia coli* from animals, their incidence and detection, p. 69-72. In M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.). Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.

148. YAMASAKI, S.; FURUTANI, M.; ITO, K.; IGARASHI, K.; NISHIBUCHI, M. and TAKEDA, Y. (1991). Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. **Microb. Pathog.** **11**: 1-9.

149. YANO, T.; LEITE, D. S.; CAMARGO, I. J. and CASTRO, A. F. P. (1986). A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Microbiol. Immun.** **30**: 495-508.

150. ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A. and SIDDONS, C. A. (1992). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **J. Med. Microbiol.** **39**: 155-158.