



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

GIOVANA RUEDA BARBOZA

Perfil de resistência e virulência de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de plantas de
processamento de queijo tipo minas frescal

Campinas

2018

GIOVANA RUEDA BARBOZA

Perfil de resistência e virulência de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de plantas de processamento de queijo tipo minas frescal

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Nathalia Cristina Cirone Silva

Este exemplar corresponde à versão final dissertação/tese defendida pela aluna Giovana Rueda Barboza, e orientada pela Profa. Dra. Nathalia Cristina Cirone Silva

Campinas

2018

Agência (s) de fomento e nº (s) de processo (s): CNPq, 23038.000795/2018-61

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Marcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

B234p Barboza, Giovana Rueda, 1992-
Perfil de resistência e virulência de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas de plantas de processamento de queijo tipo minas frescal / Giovana Rueda Barboza. - Campinas, SP: [s.n.], 2018.

Orientador: Nathalia Cristina Cirone Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Escherichia coli* - Patogenicidade. 2. Laticínios. 3. Drogas - Resistência em micro-organismos. 4. Virulência. I. Silva, Nathalia Cristina Cirone. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Resistance and virulence profile of diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from the process chain of minas frescal cheese

Palavras-chave em inglês:

Escherichia coli - Pathogenicity

Dairy industry

Drug resistance in microorganisms

Virulence

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Nathalia Cristina Cirone Silva [orientador]

Marta Cristina Teixeira Duarte

Valeria Cristina Amstalden Junqueira

Data de defesa: 28-11-2018

Programa de Pós-graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva

Presidente

DCA - FEA / UNICAMP

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Titular

CPQBA / UNICAMP

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira

Titular

ITAL

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

À Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva, pela oportunidade, orientação e ideias.

À minha família Reynolds, Mirtes, Wagne e Franciane pela força e apoio.

Ao Dr. Fabio Alves, pela ajuda na parte de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Anderson de Souza Sant' Ana, pela ajuda com equipamentos.

Aos colegas de laboratório Anderson, Laís, Norma, Karen, Leia, Vitória, Paulo, Giuliana, Raiza, Talita e Gustavo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - PROEX: 23038.000795/2018-61

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À UNICAMP, pela oportunidade da realização desse trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Resumo

O leite e seus derivados são alimentos nutritivos susceptíveis ao crescimento de micro-organismos. *Escherichia coli* é um micro-organismo encontrado nesses alimentos podendo causar diversas doenças entéricas. As *E. coli* diarreiogênicas têm fatores de virulência, como por exemplo, produção de enterotoxina e adesão, que são codificados por diferentes genes. Além dos fatores de virulência, essas bactérias podem também adquirir resistência a antimicrobianos, o que tem se tornado um problema de saúde pública: tal fato tem aumentado devido ao uso inadequado de antimicrobianos na pecuária, principalmente, em relação a doses e tempo de tratamento dos animais. Assim, este trabalho teve como objetivos isolar *E. coli* em plantas de processamento de queijo tipo Minas frescal, identificar genes de virulência, realizar o perfil de resistência e identificar cepas produtoras de β -Lactamase de Amplo Espectro (ESBL). Foram realizadas coletas de amostras de matéria prima, ambiente e produto final em seis laticínios (convencionais e orgânicos) da região de Campinas-SP. Foi utilizada a técnica do Número Mais Provável para quantificação de coliformes termotolerantes e os tubos positivos foram inoculados em Ágar Eosina Azul de Metileno Levine EBM e Ágar MacConkey, seguidos de testes bioquímicos para identificação de *E. coli*. As cepas identificadas tiveram seu DNA extraído e foram “pesquisados” os genes de virulência *eae*, *bfpA*, *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *itA*, *Est*, *ipaH*, *aafII*, *aggR*, *aatA*. O perfil fenotípico de resistência a antibióticos foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar utilizando-se vinte antimicrobianos. Para a identificação de ESBL, o disco de amoxicilina-ácido clavulânico (beta-lactâmico) foi colocado entre um disco de ceftazidima (cefalosporina) e outro de cefotaxima (cefalosporina) por sobreposição. Nesse estudo pode-se observar que coliformes presuntivos, termotolerantes e *E. coli* estavam presentes nas amostras dos laticínios, pois foram encontrados ao final das coletas 227 amostras, sendo elas: 47 de queijo, 103 de ambiente, 30 de utensílios, 13 de leite pasteurizado, 19 do leite cru e 15 de coágulo e salmouras. Houve diferença entre os resultados obtidos a partir dos diferentes tipos de laticínios, sendo que nos orgânicos foi encontrado maior número de amostras contendo *E. coli*. Em amostras isoladas de queijo foram identificadas cepas resistentes aos antibióticos. Para reduzir a contaminação microbiológica neste tipo de alimento é importante uma conscientização dos funcionários dos laticínios, da população, do próprio produtor, dos profissionais da saúde e da população. Melhorar as condições higiênico-sanitárias desde a produção até o produto final, reduzindo o uso indiscriminado de antimicrobianos e deste modo evitar a resistência bacteriana e diminuir a disseminação dos micro-organismos resistentes. Para melhorar essa situação é necessária fiscalização mais efetiva na produção em

laticínios de pequeno porte, programas de treinamento de Boas Práticas de Fabricação e condições higiênico-sanitárias, e efetuar a higienização adequada na planta de processamento e dos manipuladores a fim de diminuir a contagem de coliformes termotolerantes e *E. coli*.

Palavras chaves: *E. coli* enteropatogênicas, laticínios, resistência.

Abstract

Dairy products are nutritious foods susceptible to the growth of microorganisms. *Escherichia coli* is a microorganism found in these foods that can cause various enteric diseases. Diarrheogenic *E. coli* strains have virulence factors, such as enterotoxin production and adhesion, which are encoded by different genes. In addition to the virulence factors, these bacteria can also acquire resistance to antimicrobials, which has become a public health concern: this fact has increased due to the inadequate use of antimicrobials in livestock, mainly in relation to doses and time of treatment of the animals. The objective of this work was to isolate *E. coli* in Minas Frescal-type cheese processing plants, to identify virulence genes, to perform the resistance profile and to identify broad-spectrum β -lactamase (ESBL) producing strains. Samples of raw material, environment and final product were collected in six dairy products (conventional and organic) from the region of Campinas-SP. The Most Probable Number technique was used for quantification of thermotolerant coliforms and the positive tubes were inoculated with Levine EBM Methylene Blue Agar and MacConkey Agar, followed by biochemical tests to identify *E. coli*. The identified strains had their DNA extracted and the virulence genes *eae*, *bfpA*, *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *itA*, *Est*, *ipaH*, *aafII*, *aggR*, *aatA* were detected through PCR technique. The phenotypic profile of antibiotic resistance was obtained by agar-diffusion method using twenty antimicrobials. For the identification of ESBL, the amoxicillin-clavulanic acid (beta-lactam) disc was placed between a ceftazidime (cephalosporin) disc and another of cefotaxime (cephalosporin) by overlap. In this study it can be observed that presumptive coliforms, thermotolerant coliforms and *E. coli* were present in the dairy samples, since 227 samples, it was found at the end of the samples: 47 cheese, 103 ambience, 30 utensils, 13 milk pasteurized, 19 raw milk and 15 curd and pickle. It was found in the final product which is consumed without further processing. There was a difference between the results obtained from the different types of dairy products, and in the organic samples a greater number of *E. coli* samples were found. In strains isolated from cheese, strains resistant to antibiotics were identified. In order to reduce microbiological contamination in this type of food, it is important to raise awareness among dairy employees, the population, the producers themselves, health professionals and the population. To improve hygienic-sanitary conditions from production to final product, reducing the indiscriminate use of antimicrobials and thus avoiding bacterial resistance and reducing the spread of resistant microorganisms. For improve this situation, is necessary more effective inspection of small dairy products, Good Manufacturing Practices training programs and hygienic-sanitary

conditions and proper hygiene in the processing plant and manipulators are necessary in order to reduce the count of thermotolerant coliforms and *E. coli*.

Key words: enteropathogenic *E. coli*, dairy, resistance.

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos específicos.....	13
3.1. Micro-organismos em alimentos	14
3.2. Classificação de <i>Escherichia coli</i>	14
3.3. <i>E. coli</i> em alimentos	17
3.4. Resistência bacteriana	18
3.5. <i>E. coli</i> x produtos lácteos	22
3.6. Boas Práticas de Fabricação	24
4. Material e métodos	26
4.1. Obtenção das amostras	26
4.3. Caracterização molecular	28
4.4. Perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos	30
4.5. Investigação de <i>E. coli</i> produtoras de β Lactamase de Amplo Espectro (ESBL)	31
4.6. Análise estatística	31
5. Resultados e discussão	32
5.1. Análise microbiológica	32
5.2. Análise por Biologia Molecular	39
5.3. Análise de susceptibilidade a antimicrobianos.....	41
Conclusão	47
Referências	48

1. Introdução

Alimentos e água podem veicular micro-organismos patogênicos ou deteriorantes e metabólitos microbianos, portanto a produção de alimentos merece atenção e cuidados a fim de evitar que a transmissão de doenças por alimentos ocorra nos consumidores (AGUIAR *et al.*, 2006; PINHEIRO, *et al.*, 2010).

Dentre os vários micro-organismos existentes estão os coliformes que são micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae, que são capazes de fermentar a lactose com consequente produção de gás. Eles indicam contaminação de origem fecal (termotolerantes) e ambiental (totais) (FRANCO; 2004).

Coliformes termotolerantes são bactérias da família Enterobacter que fermentam a lactose com produção de gás a 44,5°C. A bactéria *Escherichia coli*, pertencente ao grupo dos coliformes, é uma bactéria de grande importância na maioria dos alimentos de origem animal, por estar presente na microbiota intestinal dos animais de sangue quente (ALEIXO, 1996; PEREIRA, 1999; SILVA *et al.*, 2006; BIEN, 2012).

Há vários tipos de alimentos que são susceptíveis ao crescimento de micro-organismos, dentre eles o leite e seus derivados, os quais são muito consumidos pela população mundial.

Nos produtos lácteos a presença de coliformes e *E. coli* é muito comum, pois é uma bactéria da microbiota do animal, porém o índice elevado dos mesmos pode ocasionar doenças e deteriorações organolépticas e nutricionais no produto. Isso pode ocorrer devido à falha na aplicação das Boas Práticas de Higiene.

Por isso a identificação dos principais pontos de contaminação e as características genotípicas desses isolados nos laticínios é importante epidemiologicamente para alertar sobre a presença desse micro-organismo nas plantas de processamento.

A presença dessas bactérias pode ocasionar um grande problema financeiro, pois segundo dados da Associação Brasileira de Indústria de Alimentos, o setor de laticínios está entre os principais setores da indústria alimentícia em relação ao faturamento líquido da ordem de bilhões anuais (CARVALHO, 2010; ABIA, 2017).

Em muitos trabalhos recentes tem sido observado o relato da presença de *E. coli* diarreio gênica em laticínios (CDC, 2010; CANIZALEZ-ROMAN *et al.*, 2013; GHATAK *et al.*, 2013, FONSECA *et al.*, 2014; NAGY *et al.*, 2015, AHMED e SHIMAMOTO, 2015; MOTTIN *et al.*, 2016). Tais dados geram preocupação com a saúde humana, saúde dos consumidores e com a qualidade dos alimentos, sendo necessárias maior conscientização e

capacitação dos manipuladores para que as indústrias possam disponibilizar no mercado um produto seguro ao consumidor.

Muitas bactérias encontradas em laticínios podem ser resistentes aos antibióticos, por isso é necessário identificar resistência e, principalmente, se são produtoras da enzima ESBL, que é o principal mecanismo de resistência da bactéria.

Atualmente, se busca cada vez mais informações sobre a resistência e virulência de isolados de micro-organismos em alimentos. Sendo possível tomar melhores medidas para evitar a contaminação de laticínios, bem como a disseminação de cepas virulentas e resistentes.

2. Objetivos

Isolar, identificar e caracterizar *E. coli* em amostras de planta de processamento de laticínios produtores de queijo tipo Minas frescal convencional e orgânico do estado de São Paulo.

2.1. Objetivos específicos

- Isolar e identificar cepas de *E. coli* de ambiente, utensílios, matéria-prima e produto final em laticínios que produzem queijo tipo Minas frescal.
- Caracterizar molecularmente por PCR as cepas através da detecção de genes que codificam os fatores de virulência *eae*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, *ltA*, *est*, *ipaH*, *aggR*, *aatA*.
- Identificar *E. coli* O157:H7 pela detecção dos genes *rfbO157* e *fliCh7*.
- Realizar o perfil fenotípico de resistência das cepas para os antibióticos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, imipenem, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, estreptomicina, fosfomicina e rifampicina.
- Identificar e caracterizar as cepas produtoras de β -Lactamase de Amplo Espectro (ESBL).

3. Revisão bibliográfica

3.1. Micro-organismos em alimentos

De acordo com o Ministério da Saúde, doenças veiculadas por alimentos (DVA) são originadas pela ingestão de alimentos e/ou de água que contenham agentes contaminantes (SVS, 2015).

É possível diferenciar e identificar os micro-organismos que podem dar início ao desenvolvimento das doenças alimentares. As bactérias Gram-positivas produzem substâncias exocelulares, capazes de causar gastroenterite e/ou neurotoxicidade. As bactérias Gram-negativas têm parede celular que é constituída por camadas de lipopolissacarídeos e fosfolípidos, onde se inserem poros constituídos por proteínas porinas sob as quais se encontra a camada de peptidoglicano (MURRAY *et al.*, 2005).

Em 2018, a Secretária de Vigilância em Saúde fez uma pesquisa mostrando surtos de doenças veiculadas por alimentos, desde 2000 até 2017. Ressaltando apenas os três últimos anos, observou-se que em 2015 foram identificados 673 surtos, em 2016, houveram 538 surtos, e, em 2017 foram 441 surtos. Os três principais agentes identificados foram as bactérias *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli é uma bactéria existente no trato gastrointestinal de humanos e de vários animais de sangue quente (BIEN, 2012), portanto é uma indicadora de contaminação fecal, sendo um dos micro-organismos que causam DVAs mais comuns há vários anos no Brasil é um indicador de contaminação fecal em alimentos “in natura”, principalmente no leite cru (SVS, 2015; SVS, 2018). São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose, produtora de lisina, urease-negativos, há cepas que produzem indol e outras não (ANVISA, 2015; KONEMAN, 2001). Doenças causadas por determinadas cepas de *E. coli* podem se manifestar de diversas formas devido à diversidade de fatores de virulência que ocorre na espécie, sendo que os genes de virulência são codificados por plasmídeos, bacteriófagos ou ilhas de patogenicidade (GYLES E FAIRBROTHER, 2010).

3.2. Classificação de *Escherichia coli*

E. coli, é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, do grupo coliforme. A família Enterobacteriaceae é composta por bactérias Gram negativas, bastonetes retos, anaeróbias

facultativas e oxidase negativas e fermentam açúcares. Dentre elas também se encontram as bactérias fermentadoras de lactose pertencentes ao grupo coliformes, sendo diferenciadas pelos termos coliformes totais e coliformes termotolerantes. Os coliformes totais são utilizados como indicadores de falhas de processo e higiene dos processos de fabricação. São capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento sendo facilmente inativados pelos sanitizantes e destruídos pelo calor. (OLIVEIRA, 2015). Os Coliformes termotolerantes também são bactérias indicadores de falhas de processo e higiene dos processos de fabricação e fermentam a lactose com produção de gás a 44,5°C (SILVA *et al*, 2006).

Dentre as cepas de *E. coli*, existem tipos que estão mais associados com doenças gastrointestinais e podem ser veiculados por alimentos. Há seis tipos diferentes de *E. coli* diarreiogênicas, as quais são classificadas de acordo com sua patogenicidade, e consequentemente há diferenças nos sintomas das doenças causadas pelas mesmas (SOUZA *et al*, 2016). Que serão apresentados aqui:

- *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC): colite hemorrágica, sangue nas fezes, síndrome hemolítico-urêmico e púrpura trombótica trombocitopênica.
- *E. coli* enterotoxigênica (ETEC): diarreia aquosa e febre baixa.
- *E. coli* enteropatogênica (EPEC): diarreia aquosa com muco, vômito e febre.
- *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC): diarreia aquosa persistente (mais de 14 dias).
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): febre e diarreia contendo muco e sangue.
- *E. coli* difusamente adesiva (DAEC): diarreia (FORSYTHE, 2013, SOUZA, 2016, SILVA, 2018).

Dentre as *E. coli* enteropatogênicas há as típicas (EPEC-t) e atípicas (EPEC-a) são frequentemente encontradas entre humanos e em animais (SOUZA, 2016).

Apesar da importância de se conhecer as características do tipo de *E. coli* que está envolvida em um surto. O diagnóstico para diferenciação dos patótipos de *E. coli* diarreiogênicas em alimentos não é uma prática comum (COURA *et al*, 2014).

As cepas de *E. coli* enteropatogênicas são conhecidas por possuírem proteínas que causam lesões conhecidas como “attaching and effacing” (ligação e desaparecimento) nas microvilosidades do intestino, sendo um plasmídeo chamado "EPEC adherence factor" (EAF) com genes envolvidos na expressão e montagem da fímbria denominada "bundle-forming pillus" (BFP), um importante fator para o processo (NATARO E KAPER, 1998; GIRON *et al.*, 1991). As cepas de *E. coli* enterohemorrágica são produtoras de toxinas Shiga e causam,

normalmente, doenças que são caracterizadas pela produção de duas citotoxinas potentes que são semelhantes às toxinas de Shiga 1 e 2 (SANDRINI, 2007).

Os elementos genéticos presentes no DNA da bactéria interferem no fator de virulência (QUIN *et al.*, 2005). Os principais genes codificadores de fatores de virulência de *E. coli* diarreio gênica são: EPEC - *eae* (proteína intimina), *bfpA*, *bfpB* (proteína BFP A e B); EHEC - *eae* (proteína intimina), *stx1*, *stx2* (shiga toxina 1 e 2); ETEC - *ItA* (toxina termolábil), *est* (toxina termoestável), EAaggEC - *aggR* (gene regulador), *aatA* (gene presente no plasmídeo de aderência), *aafII* (proteína relacionada à fímbria); EIEC - *ipaH* (gene presente no plasmídeo de invasão); DAEC - *escC*, *escJ*, *escN*, *escV* (SCHULTSZ *et al.*, 1994; SCHMIDT *et al.*, 1995; KYAW, 2003; TOMA *et al.*, 2003; ARANDA *et al.*, 2007; VIDAL, 2005; COURA *et al.*, 2014, DIAS *et al.*, 2016).

As cepas de *E. coli* enterohemorrágica produzem toxinas conhecidas como verocitotoxina (VTEC) VT1, VT2 ou Shiga toxina (STEC) *stx1*, *stx2*. VTEC e STEC é a mesma toxina com nomes diferentes (SANDRINI, 2007).

Dentre as cepas de *E. coli* enterohemorrágicas, o antígeno mais conhecido é o O157:H7, composto pelos genes *rbfbO157* e *fliCh7*. Essas cepas podem ser detectadas com o meio Ágar Sorbitol-MacConkey. Em geral, estas cepas não fermentam sorbitol e não produzem β -glicuronidase, mas há relatos de cepas positivas para esses testes, com temperatura ótima de crescimento de 37°C (JAY, 2005; BASTOS, 2009).

As cepas de *E. coli* enterotoxigências são diferenciadas, pois produzem uma ou mais enterotoxinas, sendo elas termoestáveis ou termolábeis (CESTARI, 2016).

As cepas *E. coli* enteroinvasivas invadem as células do intestino e propagam-se para as células adjacentes, semelhante à ação da bactéria *Shigella* sp., porém não produz a toxina (FORSYTHE, 2013, GONÇALVES *et al.*, 2002).

As cepas de *E. coli* enteroagregativas exibem a capacidade da aderência às células HEp-2 semelhante a “empilhamento de tijolos”. Estas carregam um plasmídeo para produção de fimbrias e da OMP (proteína de membrana externa específica) podendo causar uma diarreia persistente (JAY, 2005).

As cepas de *E. coli* de difusamente adesiva foram classificadas dessa maneira por não formar microcolônias semelhantes às EPEC em células HEP-2. É considerado um grupo independente das EPEC com potencial diarreio gênico (NATARO e KAPER, 1998).

As cepas de EPEC e EHEC contêm a ilha de patogenicidade LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) onde o gene *eae* está presente codificando a proteína intimina, muito importante para o fenômeno “attaching and effacing” (JAY, 2005, COURA *et al.*, 2014).

As cepas EIEC, EPEC e EHEC são ácidos resistentes, ao contrário das outras cepas de *E. coli*. O antígeno O157, em especial, tem o sistema ácido resistente induzido, podendo permanecer adaptado até ao pH estomacal e colonizar o intestino, competindo com os micro-organismos comensais (BASTOS, 2009).

3.3. *E. coli* e coliformes em alimentos

No Brasil foram relatados diversos surtos de DVAs envolvendo *E. coli*, sendo que na maioria deles não foram realizados ensaios para identificação dos fatores de virulência (SVS, 2015; SVS, 2018)

Em Maio e Junho de 2011 aconteceram surtos no norte da Alemanha no qual os alimentos considerados como envolvidos foram pepino, alface e tomate, sendo o principal o broto de alfafa, contaminado com *E. coli* produtora de toxina Shiga O104:H4 que causou mais de 830 casos de síndrome hemolítica urêmica (HUS) e 46 mortes. Essa mesma estirpe foi detectada em pepinos espanhóis, porém não houve ligação com o surto. As cepas associadas aos casos de síndrome hemolítica urêmica carregavam genes encontrados em dois tipos de *E. coli* diarreiogênica, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (MELLMANN, 2011; BEUTIN, 2012).

Segundo dados do Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC), em maio de 2014, nos Estados Unidos da América, foram identificados 19 casos de pessoas doentes, com idade entre 11 a 52 anos, infectadas por *E. coli* O121 ao consumirem brotos de trevo. Os pacientes, no entanto, não desenvolveram a síndrome hemolítico-urêmica e nenhuma morte foi relatada. *E. coli* é uma importante causa de doenças em humanos podendo causar uma série de consequências para os consumidores, mesmo que alguns surtos consigam ser controlados a tempo (CDC, 2014).

A pesquisa de identificação de *E. coli* é de suma importância, como já citado acima, pois é a bactéria indicadora de contaminação fecal clássica e coliforme termotolerante que pode indicar falha na higiene dos estabelecimentos e também falha de processamento (SILVA, 2014). Um estudo realizado em 20 restaurantes na cidade de Juazeiro do Norte, 50% dos estabelecimentos apresentaram presença de *E. coli* em 40% dos pratos, 30% dos garfos e faca de todos os estabelecimentos. Nesse estudo foi comparado também o tipo de serviço do restaurante e foi encontrada *E. coli* em 10% para os restaurantes que servem self-services e

20% em restaurantes populares (restaurante que serve comida abaixo do preço de mercado) (SILVA, 2014).

Em análise microbiológica feita em queijo Minas frescal na Zona da Mata Mineira foi constatada a presença de *E. coli* em 16 (32%) amostras, sendo a maior incidência em amostras de produção artesanal. O autor afirma que “a ausência de BPF (Boas Práticas de Fabricação), contaminação cruzada, seja na produção artesanal ou industrial, deficiências na distribuição, associadas às más condições de armazenamento, favorecem a presença de microrganismos no queijo” (SOUZA et al, 2017).

Na Bahia, foi realizada uma pesquisa de *E. coli* com 18 amostras de queijo Minas Frescal de 3 diferentes lotes de 3 marcas diferentes para avaliar a qualidade microbiológica, utilizando método *Petrifilm EC*, e foi constatado que das amostras avaliadas 100% dos isolados de *E. coli* estavam acima de 10^5 UFC/g. O autor sugere que essa baixa qualidade microbiológica se deve a falta de conhecimento das BPF por parte dos produtores rurais (MOTIN et al, 2016).

3.4. Resistência bacteriana

Na pecuária pode ocorrer o uso de antibióticos em doses ou tempo inadequados, pois é um medicamento utilizado de modo profilático, prevenindo supostas infecções, também utilizado para promover crescimento aumentando a eficácia alimentar por isso é muito adicionado em ração animal (PESSANHA *et al.*, 2001; RANTALA, 2004; AZEVEDO, 2005; Arias, 2012).

Aumentando, assim, a possibilidade de seleção de bactérias resistentes, que podem posteriormente, passar para o profissional que estiver manipulando, através das excreções de animais, ou, para o consumidor daquele alimento (PESSANHA *et al.*, 2001, AZEVEDO, 2005).

Assim, há preocupação por parte dos órgãos governamentais e da Organização Mundial de Saúde quanto ao uso de antibióticos no tratamento de doenças de animais (WHO, 2016, WHO, 2018; FDA, 2015).

O uso inapropriado desses medicamentos para a manutenção da saúde humana e animal é de difícil controle, pois mesmo com a legislação RESOLUÇÃO-RDC Nº 20, DE 5 DE MAIO DE 2011 que “Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias

classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação”, ainda ocorre o uso indiscriminado dos medicamentos (BEOVIC, 2006; RDC, 2011).

Os fármacos β -lactâmicos são antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *E. coli* (PESSANHA, *et al.*, 2001). Este grupo de antimicrobianos possui em seu núcleo estrutural o anel β -lactâmico, o qual confere atividade bactericida, e, são agentes que inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase. Esta enzima leva a formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas, as quais conferem à parede celular uma estrutura rígida, que protege a bactéria contra variações osmóticas (GUIMARÃES *et al.*, 2010). As principais classes que pertencem a este grupo são penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, monobactams e outros (Tabela 1). Resistência a esse grupo de antimicrobianos já foi observada (GHATAK *et al.*, 2013, TRABULSI, 2005).

Tabela 1 – Classificação dos antibióticos utilizados. Adaptado de GOODMAN & GILMAN'S, 2001; THOMSON & MOLAND, 2001; PEACH, *et al.* 2013.

Grupo	Fármacos
Penicilinas	Amoxicilina + ácido clavulânico, Ampicilina, Cefoxitina
Cefalosporinas	Cefepime, ceftazidima, cefotaxima
Carbapenens	Imipenem
Monobactams	Aztreonam
Quinolona	Ácido nalidíxico, Ciprofloxacina
Aminoglicosídeos	Estreptomicina, Gentamicina, Tobramicina,
Anfenicol	Cloranfenicol
Tetraciclina	Tetraciclina
Rifamicinas	Rifampicina
Sulfonamidas	Trimetoprim-sulfametoxazol, Sulfonamida
Outros	Fosfomicina, Trimetropina

Alguns antibióticos são largamente utilizados para uso veterinário, como Ciprofloxacina, Ácido nalidíxico, Tetraciclina, Estreptomicina, Gentamicina e podem gerar resíduos nos alimentos de origem animal (GOODMAN & GILMAN'S, 2001; SPINOSA *et al.*, 2006; ANVISA, 2007; ALMEIDA, 2012; KAZAMA e KAZAMA, 2017). Apesar de serem encontrados resíduos de cloranfenicol em alguns estudos com amostras de leite é importante ressaltar que o mesmo tem uso proibido para uso veterinário e susceptível de emprego na

alimentação de todos os animais, incluindo homem, em diversos países, inclusive no Brasil, segundo a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, DE 27 DE JUNHO DE 2003 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pois possui efeitos tóxicos altos e causam efeito supressor na medula óssea (KAZAMA e KAZAMA, 2017).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos β -lactâmicos pode ocorrer quando a proteína de ligação ao antibiótico se altera e fica com baixa afinidade para produção de β -lactamase que clivam a ligação amida do anel β -lactâmico, inativando o antibiótico (PFEIFER *et al.*, 2010).

A enzima β -lactamase é codificada em cromossomos (constitutivo) ou sítios extracromossômicos como plasmídeos ou transposons, sendo produzidas de modo ou induzidas, devido à possibilidade de ser codificada no transposons e plasmídeo, que são elementos que geram novas informações genéticas (MORAES *et al.*, 2016).

Os ácidos clavulânico, sulbactam e tazobactam foram combinados com as penicilinas para restaurar sua atividade, a despeito da presença de β -lactamases. O mecanismo de resistência das bactérias a estes medicamentos é a alteração do sítio de ação do antimicrobiano (MORAES, 2016).

A resistência dos aminoglicosídeos ocorre devido à alteração dos sítios ribossômicos, alteração na permeabilidade e modificação enzimática da droga (MORAES *et al.*, 2016).

Segundo estudo feito por Pessanha *et al.* (2001) pode haver resistência de cepas de *E.coli* com genes virulentos, uma vez que observaram que bactérias virulentas que continham determinados genes de resistência eram capazes de sobreviver e se multiplicar na presença desses fármacos (PESSANHA *et al.*, 2001).

Kumarasamy (2010) fez um estudo para verificar a resistência aos antibióticos em várias espécies de bactérias na Índia, Paquistão e Reino Unido, dentre estas *E. coli*. Observou-se resistência nos isolados de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* frente a antimicrobianos β -lactâmicos, exceto a tigeciclina e a colistina, em Chennai, Haryana, Reino Unido e em outros locais na Índia e no Paquistão. Muitos dos pacientes do Reino Unido tinham viajado para a Índia ou para o Paquistão no ano passado, ou tinham ligações com esses países.

No Brasil, foi observado presença de *E. coli* resistente à antibióticos em queijo artesanal, no estado da Bahia podendo haver impacto na saúde pública, pois foram encontradas bactérias multirresistentes (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2016).

Em estudos clínicos feitos de 2013 a 2017, em um bebê de oito dias foi desenvolvido infecções em vários locais do corpo, devido a sua mãe ser colonizada com *E.*

coli produtora de ESBL. Cinco outros neonatos, na UTIN simultaneamente também apresentaram resultado positivo para *E. coli* produtora de ESBL. Duas cepas produtoras de ESBL distintas foram implicadas, com evidência de transmissão entre mães e recém-nascidos para ambas as cepas (O'CONNOR et al, 2017).

Em um estudo feito no Egito, isolaram *E. coli* em pacientes hospitalizados e atendidos no Hospital da Universidade Ain-Shams no Cairo, de 61 isolados 52 eram de *E. coli* com perfil ESBL representando 85,25% (EL-BADAWY MOHAMED et al, 2017).

A pesquisa de *E. coli* produtora de ESBL em alimentos é importante, pois estudos recentes tem mostrado a presença desse tipo de micro-organismos em alimento comercializado e em ambiente de produção (TAMANG, 2013; BOTELHO, 2015).

Foi pesquisada *Escherichia coli* em 16 amostras de carne de frango, produzidas por quatro marcas comerciais no Brasil, e também a presença de *E. coli* produtora de ESBL. Foram encontrados 216 isolados confirmados como *E. coli*, sendo que 26 cepas apresentaram fenótipos ESBL positivos após testes de sinergia em disco duplo (BOTELHO, 2015).

Na República da Coreia foram investigados 1536 isolados de *E. coli* em bovinos, leite, fezes de bovinos, ambiente agrícola e manipuladores, para avaliação do perfil de ESBL. Um total de 84 isolados eram produtores de ESBL e resistentes a ampicilina, cefalotina e cefotaxima, mas todos mostraram-se sensíveis a imipenem e ceftazidima (TAMANG, 2013).

Em Merida, Venezuela, foram encontrados 45 isolados de *E. coli* em creme de leite, coalhada e requeijão. Foi realizado o antibiograma dos antibióticos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, ácido nalidíxico, imipenem, meropenem e ertapenem por método de disco-difusão. Das amostras avaliadas, 73% foram sensíveis a todos os antibióticos estudados, 24% apresentou resistência à ampicilina (GUILLÉN et al, 2014).

Em pesquisa realizada no Rio de Janeiro, em 2018, para avaliar a resistência de bactérias Gram-negativas aos antibióticos em queijo Minas Frescal, os resultados observaram uma resistência elevada. Todos os queijos avaliados apresentaram bactérias resistentes e em 13,3% a resistência foi observada para todos os antibióticos testados (SILVA, 2018).

Em Minas Gerais foi realizado um estudo com queijo Minas frescal produzido com leite cru, leite pasteurizado e também com queijo temperado, Todas as amostras avaliadas foram consideradas insatisfatórias do ponto de vista higiênico-sanitário. As amostras de queijo com Serviço Inspeção Federal (SIF) com isolados de *E. coli* apresentou resistência em 37,7% tetraciclina, 35,5% cefalotina, 20% estreptomicina, 11,2% ceftriaxona e 7,8% cotrimoxazol. Em amostras de queijo sem SIF observou resistência em 32,7% tetraciclina,

16% cefalotina, 13,4% ácido nalidíxico, 7,3% estreptomicina, 6% cotrimoxazol, 4,6% amicacina e 0,6% ceftriaxona. Observou resistência em queijo temperado em 58,9% de tetraciclina, 26,7% cotrimoxazol, 20% estreptomicina, 15,6% ácido nalidíxico, 10% amicacina, 8,9% cefalotina, 4,4% gentamicina, 2,2% ceftriaxona e 1,1% ciprofloxacina (OKURA e MOACIR, 2010).

No estudo de OKURA e MOACIR (2010), mostra como é importante a inspeção e também a adição de especiarias, para que o alimento tenha melhor qualidade microbiológica, observa-se que os queijo com SIF e queijo temperado tem menor resistência aos antibióticos estudados pela mesma.

Na Bahia, em amostras de leite UAT e pasteurizado foram encontrados resíduos de antimicrobianos, que pode ser devido ao desrespeito do período de carência, ou adição desses compostos para aumentar o tempo de prateleira ou falha no processo de higienização, esse fator que pode aumentar a resistência bacteriana (BRITO et al, 2016).

3.5. *E. coli* x produtos lácteos

O leite é um alimento rico em nutrientes, e por isso é considerado um meio de cultura para diversos micro-organismos transmitindo DVA e zoonoses que podem ser transmitidas para o ser humano. Portanto o cuidado com a higiene é fundamental, deve ser da ordenha até o produto final (CATÃO et al, 2001).

O setor de laticínios é um dos quatro setores com maior faturamento na indústria alimentícia brasileira (CARVALHO, 2010; ABIA, 2015). De 2011 a 2016, o setor lácteo manteve sua produção estável no Brasil (IBGE, 2016). Sendo um setor que produz muito e gera empregos.

Há relatos de isolamento de *E. coli* diarreiogênica em queijos (CANIZALEZ-ROMAN, 2013; AHMED e SHIMAMOTO, 2015) e surtos envolvendo *E. coli* e produtos lácteos já foram relatados (CDC, 2010). A preocupação aumenta quando se observa que cepas patogênicas resistentes a antibióticos isoladas de alimentos são cada vez mais comuns (CANIZALEZ-ROMAN et al., 2013; CARDOSO e MARIN, 2014, AHMED e SHIMAMOTO, 2015).

O surgimento da produção de β -lactamase de amplo espectro (ESBL) por *E. coli* é um problema de saúde pública, muito visto nas últimas décadas. Há relatos de isolamento em surtos de *E. coli* diarreiogênica e produtoras de ESBL em leite, queijos e produtos lácteos

(CANIZALEZ-ROMAN, 2013; GHATAK *et al.*, 2013; AHMED e SHIMAMOTO, 2015; CDC, 2010; NAGY *et al.*, 2015).

Sandrini (2007) fez um estudo em Pelotas-RS nos anos de 1999 e 2000 para verificar a produção de shiga toxina na bacia leiteira. Foram isolados 1127 cepas de *E.coli* a partir de 247 amostras de fezes, água e leite em bovinos leiteiros sadios, em 60 propriedades. Observou-se que, cerca de 48 % dos animais em 95% das propriedades estavam infectados com a verocitotoxina *E.coli* (VTEC). Em 5% das amostras de leite cru foram isoladas VTEC (SANDRINI, 2007).

No Rio de Janeiro foram analisadas 30 amostras de queijo minas frescal para verificar *E. coli* enteropatogênica resistente aos antibióticos amicacina, ampicilina, ampicilina-sulbactano, aztreonam, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, e trimetoprim-sulfametoxazol. Cinco cepas de *E. coli* isoladas apresentaram resistência à ampicilina (DIAS, 2012).

O processamento do queijo tipo Minas frescal (Figura 1) envolve várias etapas nas quais pode haver contaminação por *E. coli*, sendo a de coagulação uma das etapas mais preocupantes para contaminação, pois é uma etapa demorada com temperatura ótima para multiplicação de coliformes, de 32 a 34 °C, e o tanque pode estar contaminado devido à higienização ineficiente (SANTOS e HOFFMAN, 2010). Outras etapas que também são crítica envolvem manipulação como enformagem e as viragens, ocorrendo contato dos manipuladores com os queijos. Porém vale ressaltar que todo o processo precisa de controle rigoroso de higiene para evitar a contaminação.

Santos e Hoffman (2010) avaliaram cada etapa de processamento na produção de ricota e queijo Minas frescal, e observaram *E. coli* no leite pasteurizado e em maior proporção na massa, demonstrando que durante o processamento do queijo é possível haver contaminação.



Figura 1 - Etapas de processamento do queijo Minas frescal (adaptado de SANTOS e HOFFMAN, 2010).

3.6. Boas Práticas de Fabricação

Para o controle de qualidade é muito importante seguir algumas regras pré estabelecidas para que ocorra uma condição de higiene sanitária eficiente e estável, melhorando assim o shelf-life e mantendo o padrão de qualidade da fabricação e do produto.

Boas Práticas de Higiene (BPH) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são regras necessárias para que o produto tenha uma segurança para o consumidor, e, identifique e determine os pontos críticos do processo para evitar contaminação microbiana, química e física (GONÇALVES, 2009).

Segundo a ANVISA (RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 275, DE 21 DE OUTUBRO DE 2002) os estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos devem desenvolver, implementar e manter os Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs).

As instalações, equipamentos, móveis e utensílios devem ser higienizados, a água controlada, os manipuladores devem ter higiene e com saúde apta para o trabalho, os resíduos devem ser manejados, os equipamentos devem estar com a manutenção preventiva e calibração em dia, o contato com vetores e pragas urbanas deve estar controlado e integrado, matérias-primas, ingredientes e embalagens devem ser bem selecionadas e é necessário um programa de recolhimento de alimentos (BRASIL – ANVISA, 2002).

4. Material e métodos

4.1. Obtenção das amostras

Foram realizadas coletas em seis laticínios (Tabela 2) dentro do Estado de São Paulo em um raio de até 200 km de Campinas, sendo duas coletas em cada um. Em cada visita foram coletadas amostras de leite cru, leite pasteurizado, ambiente (superfície – ordenhadeira, mesa, tanque; utensílio - lira, pá, faca; e piso) e produto final (de 2 a 5 embalagens de queijo por coleta). Ao final das coletas, totalizaram 227 amostras, sendo estas: 47 de queijo, 103 de ambiente, 30 de utensílios, 13 de leite pasteurizado, 19 de leite cru e 15 de produtos intermediários (coágulo e salmoura).

As amostras coletadas foram mantidas refrigeradas até o momento da análise que foi realizada no laboratório de toxinas, na Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

Tabela 2 - Divisão das coletas de acordo com o tipo de laticínios orgânico ou convencional.

Laticínio	Tipo	Produção de leite no próprio estabelecimento
A	Orgânico	Sim
B	Orgânico	Sim
C	Orgânico	Sim
D	Convencional	Sim
E	Convencional	Não
F	Convencional	Não

4.2. Determinação de Coliformes termo-tolerantes e de *E. coli*

De acordo com o método Número Mais Provável para a análise de alimentos, 25 g $\pm$ 0,2 g ou 25 mL $\pm$ 0,2 g da amostra foram homogeneizados em 225 mL de água tamponada peptonada (BPW), em sacos plásticos apropriados, que foram levados ao homogeneizador *Stomacher* por 60 seg. Para a análise de utensílios, ambiente, equipamentos e manipuladores foram coletados amostras por swab. A partir da diluição inicial de cada amostra foi preparada

uma série de diluições decimais, utilizando-se solução salina (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

Para a análise de coliformes, foi inoculado 1 mL de cada diluição, em séries de três tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio por diluição, cada tubo contendo um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados em estufa a 36 ± 1 °C por 24-48 h. As amostras foram consideradas presuntivas e positivas para coliformes através da observação da formação de gás (no mínimo 1/10) nos tubos de Durham. Para a confirmação de coliformes termotolerantes (CT), três alçadas de cada tubo positivo foram repicadas em tubos de ensaio com 5 mL de caldo EC com tubos de Durham invertidos, seguidos de incubação em estufa a $45 \pm 0,2$ °C por 24-48 h. Após o período de incubação, a leitura foi realizada pela observação da formação de gás (no mínimo 1/10) nos tubos de Durham ou efervescência quando agitados gentilmente. A seguir, utilizando-se a tabela do NMP, foram calculados os NMP de CT por grama de amostra analisada (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

Para os tubos positivos no caldo EC foi feito o repique através da diluição para o Ágar EMB, com a finalidade de selecionar colônias de *E. coli*, uma vez que este é um meio seletivo para membros da família Enterobacteriaceae fermentadores e não fermentadores de lactose. A *E. coli* forma um centro escuro com camada metálico esverdeada. Também foram inoculados em ágar MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram-negativas, pois a concentração de sais biliares inibe os microrganismos Gram-positivos. Esse meio permite um agrupamento preliminar de bactérias entéricas e outras bactérias Gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras da lactose, incubadas a 37 °C por 24-48 h em aerobiose.

As colônias típicas de *E. coli* foram submetidas a testes bioquímicos (Tabela 3): citrato de Simmons (Figura 2) (utilização do citrato como fonte de carbono), indol (Figura 3) (produção de indol a partir do triptofano), teste de vermelho de metila (Figura 4) (produção de ácido indicando fermentação), Voges-Proskauer (Figura 5) (produção de acetoina) (KONEMAN, 2001). Após o isolamento, as cepas de *E. coli* foram conservadas em ágar nutriente, e congeladas em caldo BHI com 10 % de glicerol.

Tabela 3 - Confirmação de *E. coli* por testes bioquímicos, resultados esperados para *E. coli* (Adaptado de SILVA et al, 2010).

	Teste	Resultado	Tempo	Coloração
<i>E. coli</i>	Vermelho de metila	Positivo	48 h	Vermelho ou rosa
	Voges-Proskauer	Negativo	48h	Amarela
	Indol	Positivo/Negativo	24h	Anel vermelho ou rosa
	Citrato de Simmons	Negativo	96h	Verde

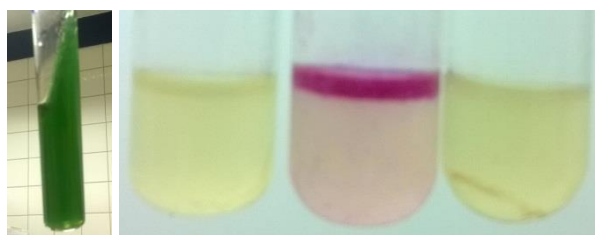


Figura 2 - teste de Citrato

Figura 3 - Teste de Indol

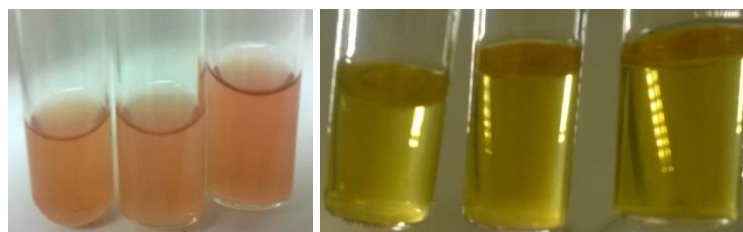


Figura 4 - Teste Vermelho de metila

Figura 5 - Teste Voges-proskauer

Figura 2, 3, 4 e 5 - Resultados esperados para *E. coli* (Fonte própria)

4.3. Caracterização molecular

Para extração, os isolados foram incubados por 18 h em uma placa de ágar Luria-Bertani (LB), e em seguida, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 200 µL de água Milli-Q estéril e após submetida à fervura por 10 min. A seguir, foi resfriada em banho de gelo por 10 min e centrifugada a 13.000 rpm por 2 min (HU et al, 1999).

Após esse processo foi feita a amplificação do DNA por reação de PCR (Polymerase Chain Reaction). Para cada reação foram utilizados 4 µL do DNA molde, 0,5 µL de Taq DNA Polymerase (feita pela aluna no laboratório), 2,5 µL tampão de PCR 1 X, 1,5 µL de cloreto de magnésio, e 0,5 µL da mistura de dNTPs (Invitrogen), 1 µL de primer reverse, 1 µL de primer forward e 13,71 µL de água miliQ. As amostras foram amplificadas com os seguintes parâmetros: 94 °C por 5 min, 35 ciclos no qual cada ciclo consiste de 1,5 min a 94 °C para desnaturação, 1,5 min para anelamento do oligonucleotídeo iniciador (Tabela 4) e 1,5 min a 72 °C durante cadeia de alongamento. Após os 35 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final a 72 °C por 5 min.

Para a classificação das cepas diarreio gênicas foi realizado a detecção dos seguintes genes relacionados com cada patotipo: *eae*, *stx1* e *stx2* (*E. coli* produtora de Shiga toxina); *eae*, *bfpA* e *bfpB* (*E. coli* enteropatogênica); *aafII*, *aatA* e *aggR* (*E. coli* enteroagregativa), *ltA* e *est* (*E. coli* enterotoxigênica); *ipaH* (enteroinvasora) (Dias et al., 2016). Além disso, foram pesquisadas cepas de *E. coli* O157:H7 (*rfbO157*, *fliCh7*). Para as cepas que não apresentarem nenhum gene de virulência foi feita a confirmação de *E. coli* com a região 16s do RNA.

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreio gênicas (Primer/Patotipo) (continua)

Genes de virulência	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho (pb)	Referência
<i>16s</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC	55	1183	MAGRAY, 2011
<i>rfbO157</i> (EHEC)	CACCAGACAATGTAACCGCTG TTGCCTATGTACAGCTAATCC	48	259	COBBAUT et al., 2009
<i>fliCh7</i> (EHEC)	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	50	625	
<i>Eae</i> (EHEC/ EPEC)	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	60	917	REID et al. (1999)
<i>bfpA</i> (EPEC)	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	56	326	GUNZBURG et al., (1995)
<i>bfpB</i> (EPEC)	GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC	63	910	Muller et al. (2007)

Tabela 4: Sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreio gênicas (Prímer/Patotipo) (continuação)

<i>stx1</i> (EHEC)	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	60	180	PATON e PATON (1998)
	AGAACGCCCCACTGAGATCATC			
<i>stx2</i> (EHEC)	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	60	325	
	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
<i>ltA</i> (ETEC)	GGCGACAGATTATACCGTGC	50	450	STACY- PHIPPS et al., (1995)
	CGGTCTCTATATTCCCTGTT			
<i>Est</i> (ETEC)	ATTTTMTTTCTGTATTRTCTT	50	190	
	CACCCGGTACARGCAGGATT			
<i>ipaH</i> (EIEC)	G TTCCTTGACCGCCTTCCGATACCG	58	600	SETHABUTR et al. (1993)
	TC			
	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTA C			
<i>aafII</i> (EAggEC)	CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG	60	378	VIDAL et al., (2005)
	ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC			
<i>aggR</i> (EAggEC)	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	52	254	TOMA et al. (2003)
	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			
<i>aatA</i> (EAggEC)	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	55	630	SCHMIDT et al. (1995)
	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			

4.4. Perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos

Foi testada a sensibilidade aos antimicrobianos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, imipenem, aztreonam, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina, fosfomicina e rifampicina.

As cepas de *E. coli* foram semeadas em caldo BHI, incubada a 35 °C por 18-24 h. A seguir, foi realizada uma diluição em salina (NaCl a 0,9%) até a escala 0,5 de MacFarland. A

diluição foi semeada na superfície do ágar Mueller-Hinton (MH) por swab e em seguida foram adicionados os discos de antibiótico. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por até 24 h, para posterior análise dos diâmetros dos halos de inibição. A investigação e interpretação deste método foram realizadas de acordo com as normas do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

4.5. Investigação de *E. coli* produtoras de β Lactamase de Amplo Espectro (ESBL)

A preparação do antibiograma foi realizada como explicado no item anterior (4.4) e foram colocados discos dos antibióticos amoxicilina-ácido clavulânico, um β -lactâmico inibidor de β lactamase em aproximação com uma cefalosporina de amplo espectro. Nas cepas produtoras de ESBL observa-se sinergia entre os discos com uma deformação do halo quando em proximidade com o amoxicilina-ácido clavulânico devido a inibição de β lactamase (Jarlier et al., 1988).

Foi realizado o antibiograma colocando o disco de amoxicilina-ácido clavulânico entre um disco de ceftazidima e outro de cefotaxima para a identificação de cepas produtoras de β -lactamase.

4.6. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o teste quiquadrado, um método estatístico utilizado para verificar se a diferença do laticínio (convencional ou orgânico) interfere na quantidade de *E. coli* encontrada no queijo.

5. Resultados e discussão

5.1. Análise microbiológica

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5), foi possível isolar e observar a presença de coliformes e *E. coli* das amostras de leite, ambiente e produto final. Na tabela 3 constam apenas as amostras positivas para coliformes totais e termotolerantes, as outras amostras apresentaram resultado de $<3\text{NMP}/\text{cm}^2$ de coliformes totais e termotolerantes.

Das 227 amostras coletadas, 44,10% continham coliformes totais e 31% apresentaram coliformes termotolerantes. As amostras consideradas positivas foram determinadas segundo a Figura 6, onde houve crescimento e fermentação de lactose com produção de gás.



Figura 6: Coliformes presuntivos e Coliformes Totais

Foi feito um estudo em Constantina – RS, com a água utilizada para irrigação na produção de alimentos em agroindústrias de pequeno porte, principalmente produtos cárneos e derivados de leite e o laticínio apresentou contaminação por Coliformes Totais e por Coliformes Termotolerantes, superiores aos permitidos pela legislação do Ministério da Saúde (VOLKWEIS et al, 2015). Lembrando que a produção de um leite de qualidade envolve boas práticas agrícolas.

Os coliformes termotolerantes são indicadores de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pois são de fácil isolamento e identificação em amostras a partir do ambiente e produto. Estes micro-organismos podem causar deteriorações indesejadas nos alimentos. No presente trabalho observou-se que nos laticínios não apresentavam condições higiênico-sanitárias adequadas, tanto em superfícies de contato direto com a produção do queijo como as de contato indireto, pois havia coliformes acima do padrão estabelecido na American Public Health Association (APHA) para mesófilos.

Considerando a média de coliformes termotolerantes por amostras média de todos os laticínios, foi possível observar que a contaminação por coliformes termotolerantes ($>3\text{NMP/g}$ ou cm^2) ocorre mais em queijo seguido do leite cru (Figura 6). É possível observar que há presença de coliformes termotolerantes no leite pasteurizado. Isso, junto com a hipótese de recontaminação pode explicar a porcentagem alta em queijos.

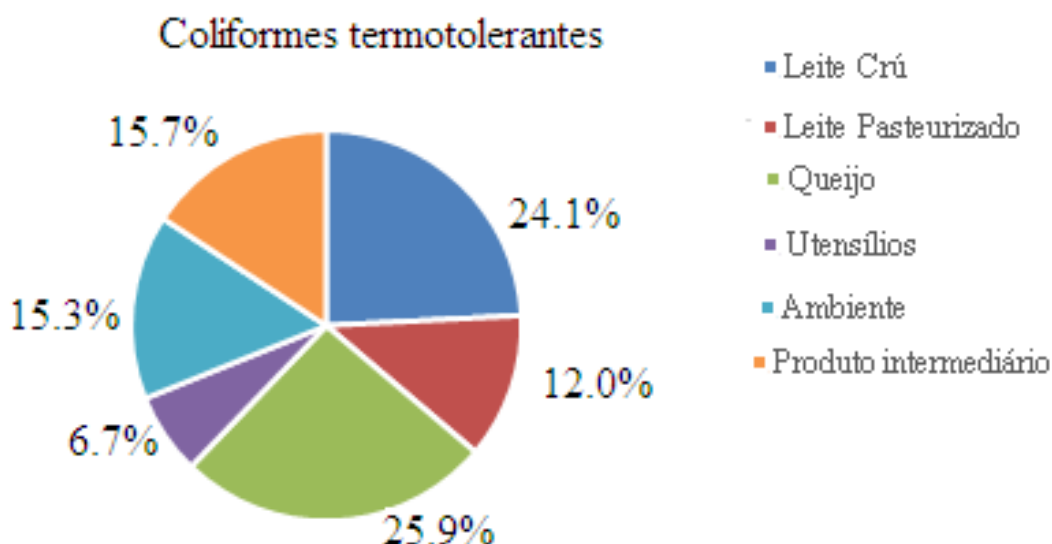


Figura 6 - Média de todos os laticínios para Coliformes termotolerantes $>3\text{NMP/cm}^2$ ou g ou mL por tipo de amostra. ($n=69$).

No laticínio A foram encontradas 6 isolados de *E. coli*, no laticínio B 9, no laticínio C 8, no laticínio D 11, no laticínio E 1 e no laticínio F 1. Sendo 23 amostras de laticínios orgânicos e 13 de laticínios convencionais. Com a análise estatística foi possível confirmar que a diferença entre o tipo de laticínio é significativa para a quantidade de *E. coli* no produto final. Essa diferença se deve a utilização de produtos não muito eficientes para o controle microbiano e contra pragas em laticínios orgânicos.

Tabela 5 - Média de coliformes presuntivos e termotolerantes (NMP) e quantidade de *E. coli* encontrada nas amostras coletadas nos laticínios visitados (continua).

Laticínio	Coleta	Origem (Apenas amostras positivas)	Coliformes presuntivos (Média) NMP/g	Coliformes termotolerantes (Média) NMP/g	<i>E. coli</i>
A	1	Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Leite Pasteurizado	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	0
		Tanque	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Ralo	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
A	2	Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	9	0
		Leite Pasteurizado	$5,6 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^2$	0
		Piso	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	0
		Forma	$1,1 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^1$	0
		Mesa	9	<3NMP/cm ²	0
		Coágulo	$2,4 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^1$	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$7,6 \cdot 10^2$	+
B	1	Leite Cru	$1,14 \cdot 10^2$	$1,14 \cdot 10^2$	+
		Ordenha	$1,1 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^2$	+
		Piso	$5,5 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^2$	0
		Piso câmara	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Mão	$5,5 \cdot 10^2$	<3NMP/cm ²	0
		Ralo	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^2$	+
B	2	Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Ordenha	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Tanque Coagulação	$1,5 \cdot 10^1$	<3NMP/cm ²	0
		Ralo	$1,1 \cdot 10^3$	<3NMP/cm ²	0
		Coágulo	$2,4 \cdot 10^2$	9	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
C	1	Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	$9,3 \cdot 10^1$	+
		Mesa	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Piso câmara	$9,3 \cdot 10^1$	$9,3 \cdot 10^1$	0
		Piso	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Lira	$5,5 \cdot 10^2$	<3NMP/cm ²	0
		Mão	$1,1 \cdot 10^3$	<3NMP/cm ²	0
		Ralo	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^2$	+
C	2	Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	0

Legenda: + amostras positivas para *E. coli*, 0 amostras negativas.

Tabela 5 - Média de coliformes presuntivos e termotolerantes (NMP) e quantidade de *E. coli* encontrada nas amostras coletadas nos laticínios visitados (continuação).

Laticínio	Coleta	Origem (Apenas amostras positivas)	Coliformes presuntivos (Média) NMP/g	Coliformes termotolerantes (Média) NMP/g	<i>E. coli</i>
C	2	Piso câmara	$1,1 \cdot 10^3$	$<3 \text{NMP/cm}^2$	0
		Ralo	$1,1 \cdot 10^3$	$<3 \text{NMP/cm}^2$	0
		Salmoura	$5,5 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^2$	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^2$	+
D	1	Leite Cru	$1,3 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^1$	+
		Pá	4	$<3 \text{NMP/cm}^2$	0
		Ralo	$1,5 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^1$	0
		Piso	7	7	+
		Mesa	9	9	+
		Lira	9	9	+
		Tanque coagulação	$2,1 \cdot 10^1$	9	+
		Queijo	$1,1 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^2$	+
		Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^2$	0
D	2	Leite Pasteurizado	$4,3 \cdot 10^1$	$4,3 \cdot 10^1$	0
		Tanque de coagulação	$1,5 \cdot 10^1$	$<3 \text{NMP/cm}^2$	0
		Mesa	$2,3 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^1$	+
		Ralo	$2,4 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	+
		Lira	$2,3 \cdot 10^1$	$<3 \text{NMP/cm}^2$	0
		Piso	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	+
		Processamento	$8,8 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^2$	+
		Queijo	$8,8 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^2$	+
E	1	Leite Cru	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	0
		Leite Pasteurizado	$2,3 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^1$	0
		Faca	$2,3 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^1$	0
		Forma Ácida	$2,3 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^1$	0
		Caixa câmara	$1,1 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^1$	0
		Mão	$2,3 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^1$	0
		Ralo	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	0
		Piso	$2,4 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	0

Legenda: + amostras positivas para *E. coli*, 0 amostras negativas.

Tabela 5 - Média de coliformes presuntivos e termotolerantes (NMP) e quantidade de *E. coli* encontrada nas amostras coletadas nos laticínios visitados (continuação).

Laticínio	Coleta	Origem (Apenas amostras positivas)	Coliformes presuntivos (Média) NMP/g	Coliformes termotolerantes (Média) NMP/g	<i>E. coli</i>
E	1	Forma	2,3*10 ¹	2,3*10 ¹	0
		Coágulo	2,4*10 ²	2,4*10 ²	0
		Piso Câmara	2,4*10 ²	2,4*10 ²	0
		Tanque coagulação	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Queijo	8,8*10 ²	4,8*10 ²	+
E	2	Leite Cru	1,1*10 ³	4	0
		Leite Pasteurizado	>1,1*10 ³	4	0
		Piso câmara Fria	4	7	0
		Caixa câmara Fria	2,4*10 ²	4	0
		Ralo	>1,1*10 ³	4	0
		Mão	2,3*10 ¹	2,3*10 ¹	0
		Coágulo	9,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Queijo	>1,1*10 ³	57	0
F	1	Leite Cru	1,1*10 ³	1,1*10 ³	0
		Leite Pasteurizado	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Lira	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Estante câmara	2,4*10 ²	<3NMP/cm ²	0
		Ralo	1,1*10 ³	4,3*10 ¹	+
		Forma	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Piso	1,1*10 ³	2,4*10 ²	0
		Queijo	3,7*10 ²	<3NMP/cm ²	0
F	2	Leite Cru	1,1*10 ³	7	0
		Leite Pasteurizado	2,3*10 ¹	4	0
		Piso câmara	2,3*10 ¹	2,3*10 ¹	0
		Tanque	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Caixa	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Forma	2,3*10 ¹	<3NMP/cm ²	0
		Ralo	1,1*10 ³	<3NMP/cm ²	0
		Piso	1,1*10 ³	9	0
		Queijo	1,6*10 ²	1,9*10 ¹	0

Legenda: + amostras positivas para *E. coli*, 0 amostras negativas.

Em todas as 12 coletas foram encontradas coliformes nas amostras de queijo. Das amostras de queijo coletadas e analisadas, 47 amostras continham coliformes totais, 31 apresentaram coliformes termotolerantes e em 28 foram observadas presença de *E. coli*. De qualquer forma, as amostras de queijo se apresentaram dentro dos padrões estabelecidos para coliformes termotolerantes segundo a RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001 – ANVISA que é para estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. (BRASIL - ANVISA, 2001).

Para diminuir a quantidade de coliformes é importante a melhoria das condições de higiene dos laticínios, sendo importante que os manipuladores ao apresentarem enfermidades que possam comprometer a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos sejam afastados da atividade. Além disso, não devem fumar, falar, cantar, assobiar, espirrar, cuspir, tossir, comer durante a manipulação. Devem usar cabelos presos e protegidos por toucas ou outro acessório apropriado. Devem lavar as mãos ao chegar ao trabalho, antes e após manipular alimentos e sempre que se fizer necessário. E os visitantes devem cumprir os requisitos de higiene e de saúde estabelecidos para os manipuladores. Os uniformes devem ser conservados e limpos. Utilizar hipoclorito de sódio, ácido peracético ou Compostos de Quaternário de Amônia, na lavagem dos sapatos, chão, equipamentos e utensílios usados dentro da planta de processamento (BRASIL – ANVISA, 2004; MENEGARO, 2016; MINBIOLE, 2016.).

No norte do Paraná foi verificada a presença de coliformes em queijo mussarela e para todas as amostras foram encontradas coliformes totais e termotolerantes abaixo do limite de legislação vigente, indicando que estes queijos estão em condições higiênico-sanitárias satisfatórias. Já em queijo Minas frescal, foram encontradas algumas amostras com valores acima do valor estabelecido pela legislação (OLIVEIRA et al, 2017).

No laticínio A podemos observar que na primeira coleta houve uma contagem alta tanto nos produtos iniciais como no produto final e ambiente sendo que *E.coli* estava presente em praticamente todas as amostras positivas para coliformes termotolerantes, exceto no leite pasteurizado. Na segunda coleta, a contaminação se manteve. A forma, um utensílio diretamente utilizado no queijo, estava com valores de $1,1 \times 10^3$ essa contagem é acima do esperado quando comparamos com o padrão permitido para superfícies pela American Public Health Association (APHA) que sugere para utensílios e ambiente por cm^2 um valor de 100UFC mesófilos. No Brasil, não há legislação para superfície. Assim, amostras com NMP acima de 100 para coliformes ficam acima do permitido pela APHA (COELHO, 2010). A

amostra do piso também apresentou quantidade alta de coliformes termotolerantes. Nas amostras de queijos, os mesmos se encontram dentro do padrão estabelecido pela ANVISA, (2001), porém está em contagem próxima da permitida pela legislação. Pode-se observar *E. coli* em amostras de coágulo e queijo, fato preocupante, uma vez que a *E. coli* pode ser patogênica. Esses resultados indicam uma falha no procedimento de higienização, essa falha pode-se levar em conta vários fatores, como, resíduos de leite nas superfícies, animais sem as lavagens adequadas, ambientes abertos para a produção sem sistemas anti-pragas.

No laticínio B, na primeira coleta o piso e o ralo apresentaram contagem de coliformes alta. O piso apresentou na primeira coleta coliformes termotolerantes e na segunda coleta apresentou $<3\text{NMP}/\text{cm}^2$ de coliformes totais e termotolerantes, já o tanque de coagulação na primeira coleta não apresentou coliformes nem *E. coli*, porém foi observado contagem de coliformes totais na segunda coleta, mostrando que a higienização não foi uniforme durante as coletas em relação ao ambiente. Na segunda coleta, o ralo continuou com contagem de $1,1 \times 10^3$ para Coliformes presuntivo. *E. coli* foi encontrada nas duas coletas no leite cru, queijo e ambiente.

No laticínio C, na primeira coleta, houve uma contagem acima de $100\text{UFC}/\text{cm}^2$ de coliformes termotolerantes, nas amostras de ordenhadeira, mesa, tanque de coagulação e piso. Na segunda coleta, foi encontrado *E. coli* somente no queijo e na salmoura, algo preocupante porque a salmoura não apresentou contaminação na primeira coleta, mostrando que pode ter ocorrido uma contaminação cruzada nessa parte do processo.

No laticínio D, na primeira coleta todas as amostras estavam dentro do padrão de referência de $100\text{UFC}/\text{cm}^2$ para mesófilos. Na segunda coleta, o piso do processamento apresentou contagens altas de coliformes termotolerantes.

No laticínio E, na primeira coleta, as amostras coletadas do leite cru e ralo estavam com contagem de $1,1 \times 10^3$ para Coliformes Totais considerando acima do valor esperado, havia *E.coli* no queijo o qual tinha coliformes termotolerantes, no valor dentro do permitido. Na segunda coleta, as amostras em todo o processo estavam com quantidade de coliformes dentro do valor de referência, porém o processo pode estar com números baixos de coliformes e pode haver contagem de mesófilos. Na coleta 2 não foi encontrada cepas de *E. coli*.

No laticínio F, na primeira coleta o piso estava com contagem de $2,4 \times 10^2$ sendo acima da referência estabelecida pelo APHA, havia *E. coli* apenas no ralo. Na segunda coleta, ocorreu o mesmo do laticínio E, todas as amostras de coliformes estavam dentro do limite em todo o processo e não houve contagem de *E. coli*.

No presente trabalho das 227 amostras coletadas *Escherichia coli* foi encontrada em 33 amostras (Figura 7) e apenas uma amostra, isolada de amostra do piso foi confirmada para *E. coli* diarreiogênica (ETEC). Dessas 33 amostras 2,94 % da lira, 5,88 % de ordenhadeira, 2,94 % de salmoura, 5,88 % de coágulo, 5,88 % de tanque de coagulação, 8,82 % da mesa, 11,76 % de piso, 14,70 % de ralo, 14,70 % eram de leite cru, 26,47 % de queijo. Observa-se que as amostras de leite pasteurizado não apresentaram contaminação por *E. coli*, porém o micro-organismo foi observado em queijo e isso mostra que por mais que a pasteurização diminua a contagem de bactérias e diminua as formas vegetativas dos patógenos pode ocorrer uma recontaminação pelo ambiente, processamento ou manipulador.

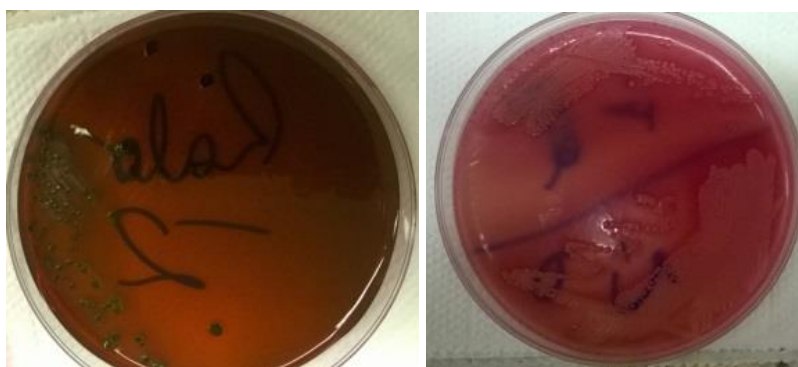


Figura 7 - Características morfológicas das colônias de *E. coli* isoladas no meio Levine e MacConkey incubadas a 37 °C por 24h.

5.2. Análise por Biologia Molecular

De acordo com as análises feitas de cada gene de *E. coli* diarreiogênica foi observado apenas um isolado de amostra do piso com a presença do gene *est*, o que a caracteriza como ETEC.

Podemos observar que os isolados não foram positivos para EHEC, um dos grupos mais severos de *E. coli*, pois causam sangue nas fezes, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica e púrpura trombótica trombocitopênica, sendo protagonista de vários surtos ocorridos na Europa e América, causando mortes.

Os genes *flicH7* e *rbfbO157* são os presentes no sorotipo O157:H7. Contudo, é importante ressaltar que no presente estudo os genes *flicH7* e *rbfbO157* não foram encontrados em nenhuma amostra. Os genes *stx1* e *stx2* também não foram isolados em nenhuma cepa isolada como observado na Figura 8. Assim como em um estudo feito no Paraná foram coletadas 20 amostras de leite cru na região de Londrina e não foram encontradas *E. coli* com gene *stx* (SILVA et al, 2016). Correlacionando o estudo de Silva

(2016) com este trabalho, o resultado é semelhante em relação ao gene *stx*. Mesmo não sendo encontrado nos laticínios é importante a continuação desse tipo de estudo, pois como mencionado anteriormente *E. coli* com gene *stx* pode ser veiculada por alimento e levar o consumidor a adoecer e até a óbito.

O gene *eae* (EPEC ou EHEC) foi encontrado em cepas isoladas de três laticínios, totalizando cinco cepas, uma em leite cru (laticínio D primeira coleta), três em queijo (laticínio B segunda coleta, D segunda coleta e E primeira coleta) e uma no ralo (laticínio D segunda coleta). Porém como os genes *bfpA* e *bfpB* não foram encontrados estes isolados não podem ser caracterizados como *E. coli* diarreiogênica.

Segundo um levantamento bibliográfico de Souza (2016), há relatos de EPEC causando diarreia desde 1940, porém os isolados do presente estudo foram negativos para os genes *bfpA* e *bfpB*.

Dentre as amostras analisadas do grupo de *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC) não foi observada nenhum isolado contendo a presença de amplificação do gene *lta*, apenas o *est* foi encontrado em um laticínio, em amostra do piso.

Foi feito um estudo no Sul do Brasil com PCR multiplex em tempo real para detectar fatores de virulência (toxinas e fímbrias), em amostras de diarreia de aves e suínos. No referido estudo foram obtidos 25 isolados de *E. coli* com fatores de virulência, sendo que 40 % dessas amostras positivas foram encontradas no PR, 32% no RS e 28% em SC. Foram caracterizados isolados com uma (36%) ou duas (16%) fímbrias, e bactérias com uma (48,3%), duas (16%) e três (4%) toxinas. Apenas 39,7% dos isolados apresentaram os genes que codificam os fatores de virulência de ETEC (CERVEIRA et al, 2008).

Em Londrina, no Paraná, investigou-se a presença de *E. coli* em queijo de leite cru, onde foram analisadas 147 amostras de queijo Minas e destas, 28 amostras apresentaram *E. coli*. A partir da análise por PCR foi encontrada uma amostra de *E. coli* EPEC atípica, que comumente causa diarreia em crianças (CAMPOS et al, 2017).

De acordo com os resultados observados no presente estudo, a *E. coli* diarreiogênica não está presente no queijo e nem no processo em geral, pois foi isolada e encontrada apenas em amostra de piso, o que minimiza os riscos, entretanto a presença de *E. coli* no processo deve ser considerada, pois é pouco provável não ocorrer *E. coli* em laticínios, no Brasil, pois é uma bactéria existente no trato gastrointestinal.

5.3. Análise de susceptibilidade a antimicrobianos

De acordo com os resultados dos antibiogramas pode-se observar que todos os isolados foram resistentes à rifampicina, o que era de se esperar, pois não esta na lista de antibióticos indicados para *E. coli*, segundo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2014) (CLSI). Em relação aos outros antibióticos em sua maioria foram sensíveis. A Tabela 6 representa a quantidade de isolados sensíveis, resistentes e intermediários. Os intermediários são aqueles em que a concentração de crescimento que não permite a visualização macroscópica bacteriana é próxima à concentração sérica máxima, podendo ser utilizado no caso de contraindicação de doses elevadas (ANVISA, 2018).

Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* obtidos em amostras de laticínios.

		Penicilinas						Cefalosporinas									Carbapens					
		Amox+Clav			Ampicilina			Cefoxitina			cefepime			Ceftazidina			Cefotaxina			Imipenen		
Origem	Isolado	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Leite Crú	8	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	12.5	87.5	0%	0%	100%	0%	13%	87%
Ordenha	6	7%	0%	83%	0%	0%	100	17%	0%	83%	17%	0%	83%	17%	0%	83%	17%	0%	83%	0%	0%	100%
Coágulo	2	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	50%	0%	50%
Salmoura	1	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
Tanque	4	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	50%	50%	0%	0%	100%
Piso	9	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	11%	89%	11%	0%	89%
Ralo	8	0%	0%	100%	12%	0%	88%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
Mesa	5	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Lira	1	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Queijo	72	0%	3%	97%	22%	3%	75%	0%	2%	98%	0%	4%	96%	3%	6%	91%	8%	11%	81%	3%	12%	85%

		Monobactams			Quinolonas						Aminoglicosídeos									Anfenicol		
		Azteonam			Ciprofloxacino			Ac Nalidi			Estreptomicina			Gentamicina			Tobramicina			Cloranfenicol		
Origem	Isolados	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Leite Crú	8	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	25%	0%	75%	0%	0%	100%	13%	0%	87%	0%	0%	100%
Ordenha	6	17%	17%	66%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	17%	83%	0%	0%	100	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Coágulo	2	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Salmoura	1	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Tanque	4	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Piso	9	11%	0%	89%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	11%	0%	89%
Ralo	8	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Mesa	5	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Lira	1	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Queijo	72	6%	8%	86%	0%	4%	96%	8%	0%	92%	17	1%	82	4%	1%	95%	3%	3%	94%	3%	0%	97%

		Tetraciclinas			Rifamicinas			Sulfonamidas			Outros								
		Tetraciclina			Rfampicina			Sulfonam			Trimetr+sulfon			Trimetop			Fosfomicina		
Origem	Isolados	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Leite Crú	8	0%	0%	100%	100%	0%	0%	13%	0%	87%	0%	13%	85%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Ordenha	6	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	33%	0%	67%	0%	0%	100%
Coágulo	2	0%	0%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
Salmoura	1	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
Tanque	4	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Piso	9	11%	0%	89%	100%	0%	0%	22%	0%	78%	11%	0%	89%	11%	0%	89%	0%	0%	100%
Ralo	8	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
Mesa	5	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Lira	1	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Queijo	72	15%	1%	84%	100%	0%	0%	24%	1%	75%	8%	0%	92%	19%	1%	80%	1%	4%	95%

Legenda: R – resistência; I – intermediário; S – sensível.

O estudo de bactérias com perfil de ESBL é de grande importância, pois são enzimas produzidas por Enterobactérias para hidrolisar os antibióticos utilizados contra as mesmas, isso pode dificultar o tratamento podendo levar o paciente a óbito. Levando-se em consideração que na área clínica são encontrados muitos casos de isolados com esse perfil (SHAIKH et al, 2015). No presente trabalho, nenhuma cepa foi característica para ESBL.

É importante ressaltar que neste trabalho nenhuma cepa se apresentou com perfil ESBL (β -lactamase de amplo espectro). A Figura 9 – 3 é apenas de um isolado, porém em todas as amostras que foram colocados discos dos antibióticos amoxicilina-ácido clavulânico, em aproximação com duas cefalosporina de amplo espectro, não foi observado ação sinérgica.



Figura 9: Antibiograma de *E. coli* isolada de queijo. Sensibilidade a ampicilina, imipenem, aztreonam, cefepime, cefoxitina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina, fosfomicina e rifampicina nas figuras 9 -1 e 9-2. Na Figura 9-3 para verificar perfil ESBL (β -lactamase de amplo espectro) amoxicilina-ácido clavulânico (beta-lactâmico) foi colocado entre um disco de ceftazidima (cefalosporina) e outro de cefotaxima (cefalosporina).

A multiresistência bacteriana é um grave problema de saúde pública, tem sido muito observada no ambiente hospitalar e na prática veterinária. Estando associada ao uso inadequado de antibióticos, algo que dificulta o tratamento, fazendo com que seja longo ou até que não tenha efeito podendo levar o paciente ao óbito (LOUREIRO, et al 2016).

Tais antibióticos amoxicilina-ácido clavulânico, aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e tobramicina foram eficientes com uma sensibilidade alta de 80 – 100%.

No laticínio A foram encontrados cinco isolados de *E. coli* multirresistentes, sendo quatro de queijos e um de coágulo. Essas cepas foram resistentes aos aminoglicosídeos, cefalosporinas, sulfonamidas, e trimetropina.

No laticínio B, ocorreram 11 cepas multirresistentes, uma proveniente de amostras de leite recém-ordenhado e dez de produto final. Essas cepas foram resistentes às penicilinas, cefalosporinas, carbapens, monobactams, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e trimetropina.

No laticínio D, foram detectadas três cepas multirresistentes, uma isolada de amostra do piso e outras duas de queijo. Essas cepas foram resistentes às penicilinas, carbapens, monobactams, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas e trimetropina.

Em Maringá – PR foi feito um estudo isolando 95 *E. coli* em amostras de leite de vaca pasteurizado. Todos os isolados eram sensíveis a amoxicilina-ácido clavulânico, aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e tobramicina. As maiores taxas de resistência foram observadas para cefalotina (55,78%) e ampicilina (26,31%). Esses resultados são preocupantes, pois a pasteurização ocorre para que elimine as células vegetativas do leite, e foi isolada 95 cepas e dessas uma quantidade significativa de resistentes aos antimicrobianos (OLTRAMARI et al, 2014).

Fazendo uma correlação com os resultados do presente estudo e de OLTRAMARI, (2014), pode-se observar que as cepas testadas, em sua maioria apresentaram sensibilidade aos antibióticos.

No presente estudo, os isolados provenientes das amostras de queijo foram resistentes a Ampicilina 22 %, Imipenem 3 %, Aztreonam 6 %, Cefotaxima 8 %, Ceftazidima 3 %, trimetoprim-sulfametoxazol 8 %, Tetraciclina 15 %, Cloranfenicol 3 %, Ácido nalidíxico 8 %, Gentamicina 4 %, Tobramicina 3 %, Estreptomicina 17 %, Fosfomicina 1 % e Rifampicina 100 %.

Diante dos dados avaliados de estudos recentes pode-se observar que no Brasil são encontradas cepas resistentes em diversos alimentos, então é necessário uma melhoria no controle de transferência dessas cepas resistentes e conscientização do uso racional de medicamentos tanto na clínica humana e animal como na agropecuária.

Os dados de multirresistência são muito preocupantes, pois isso dificulta o tratamento e é um problema de saúde pública, pois infecções matam milhares de pessoas todos os anos. A Organização Mundial da Saúde e o Centro de Controle de Prevenções de

Doenças definiram a resistência microbiana como uma crise global, que se deve ao uso indevido de antimicrobianos (OMS, 2018).

Há um novo conceito conhecido como saúde única (One Health) para projetar e implantar programas, políticas, legislação e pesquisa em que vários setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados de saúde pública. As áreas de trabalho incluem segurança alimentar, controle de zoonoses, e combate à resistência a antibióticos, pois muitos micro-organismos infectam animais e seres humanos, pois vivem no mesmo ecossistema. Muitos profissionais que atuam em diferentes setores, como saúde pública, saúde animal, fitossanidade e meio ambiente, devem se unir para detectar, responder e prevenir surtos de zoonoses e problemas de segurança alimentar e fornecer orientações sobre como reduzir esses riscos (WHO, 2017).

O alimento pode ser um veículo de bactérias multirresistentes, e observar esses micro-organismos nas amostras de queijo são preocupantes, uma vez que o mesmo é um alimento pronto para o consumo. A presença dessas bactérias pode causar infecção intestinal no consumidor podendo levar a óbito no caso de cepas mais severas e que podem ser multirresistentes a antibióticos.

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 7), observamos que *E. coli* está presente em sua maioria nas amostras de queijo, algo preocupante mesmo não contendo genes caracterizando-as como cepas diarreiogênicas, pois indica uma falha no processo de implantação de Boas Práticas de Fabricação e o consumo desse queijo pode ser considerado um risco para saúde pública. É possível notar que no leite pasteurizado não houve presença de *E. coli*, o que mostra que pode ter ocorrido uma contaminação cruzada a contaminação pós processamento.

Há contaminação no ambiente e em um utensílio o que mostra que as condições de higiene precisam ser revisadas e alteradas. Foram identificadas cepas resistentes aos antibióticos, sendo cepas isoladas, em sua maioria, de queijo.

Para evitar a resistência bacteriana é importante a prevenção e controle da disseminação dos micro-organismos resistentes, o produtor deve respeitar o tempo de carência dos antibióticos utilizados até a coleta do leite e pesquisas de novos fármacos que essas bactérias ainda não sejam resistentes.

Tabela 7 - Perfil de resistência e virulência de *E. coli* confirmadas, em amostras obtidas de Leite Cru e Ordenha, Queijo, Utensílios, Ambiente e Produtos intermediários.

Origem	Isolados <i>E. coli</i> (n=33)	Porcentagem de Amostras positivas (%)	Gene de virulência (n)	Resistência a antibióticos
Leite Cru e Ordenha	7	20,58%	<i>eae</i> (1)	AMC(7%), AZT(17%), CFO(17%), CPM(17%), CFX(17%), CAZ(17%), SDT(11%), TOB(13%), ESP(25%) e RIF(100%).
Queijo	9	26,47%	<i>eae</i> (4)	AMP(22%), IMP(3%), AZT(6%), CFO(8%), CAZ(3%), SDT(8%), TET(15%), CLO(3%), NAL(8%), GEN(4%), TOB(3%), ESP(17%), FOS(1%) e RIF(100%).
Utensílios	1	2,94%	0	RIF(100%).
Ambiente	14	41,17%	<i>est</i> (1), <i>eae</i> (1)	AMP(12%), IMP(11%), AZT(11%), CFO(100%), TET(11%), CLO(11%), e RIF(100%).
Produto intermediário	3	8,82%	0	IMP(50%), CFO(100%), ESP(100%) e RIF(100%).
Total	34	100,00	<i>est</i> (1)	

AMP: Ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, IMP: imipenem, AZT: aztreonam CFO: cefotaxina, CPM: cefepime, CFX: ceftazidima, CAZ: ceftazidima, SDT: trimetoprim-sulfametoxazol, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, ESP: estreptomicina, FOS: fosfomicina e RIF: rifampicina.

Conclusão

Foram observadas 34 amostras com presença de *E. coli*. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que coliformes termotolerantes e *E. coli* estão presentes nos laticínios, principalmente orgânicos e foram encontrados no produto final que é um alimento pronto para o consumo.

De todos os isolados apenas uma cepa foi considerada diarreiogênica, sendo isolada de piso.

Foram identificadas cepas resistentes aos antibióticos, sendo 48,48% de cepas multirresistentes, em sua maioria, de queijo.

Referências

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Número do setor – Faturamento. Acessado em 06.09.18. Disponível em <<https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2017.pdf>>

AGUIAR, C.; PEREIRA, L.; MAZZONETTO, C.; SIMONY, R. F.; MARÇAL, I. G. T. Implementação de boas práticas de manipulação em uma creche do município de São Paulo. Cadernos. Centro Universitário S. Camilo, São Paulo, v.12, n.1, p.47-57, jan./mar. 2006.

AHMED, A.M., SHIMAMOTO, T. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, v. 193, n. 16, p. 68–73, 2015.

ALEIXO, J.A.; AVER, G.P.; Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in foods of animal origin in Southern Brazil. Ciência Rural, v.26, nº 2, Santa Maria-RS, 1996.

ALMEIDA, M.P.; REZENDE, C.P.; SOUZA, L.F.; BRITO, R.B. Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine, and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants. Londres, v. 29, n.4, p.517-525, abr. 2012.

ARANDA, K.R., FABBRICOTTI, S.H., FAGUNDES-NETO, U., SCALETSKY, I.C. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiology Letters, v.267, n.2, p.145-150, 2007.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, abr. 2012.

AZEVEDO, F.M. Microrganismos multirresistentes. In: OLIVEIRA, A. C. (Org.). Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção controle. Guanabara Koogan, p. 341-47, Rio de Janeiro: 2005.

BASTOS, P. A. M. B. Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em iogurtes. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária: Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Niterói – RJ, 18 – 20. 2009.

BEOVIC, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 280-287. 2006

BIEN, J., SOKOLOVA, O., BOZKO, P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Nephrology*, v.2012, 2012.

BEUTIN, L; MARTIN, A. Outbreak of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No. 2, Pages 408–418. 2012.

BOTELHO, L. A. B.; KRAYCHETE, G. B.; COSTA E SILVA, J. L.; REGIS, D. V. V.; PICÃO, R. C.; MOREIRA, B. M.; & BONELLI, R. R. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 249-254, 2015.

BRASIL - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001. ANVISA. 2001. Acessado em 08.09.18. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>

BRASIL - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, p.14–27, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf> Acessado em 24.10.2015.

BRASIL - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO RDC Nº 216, DE 15 DE SETEMBRO DE 2004. ANVISA. 2004. Acessado em 22.09.18. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O-RDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>>

BRASIL - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos, bases teóricas e uso clínico. 2007. Acessado em 20.09.18. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>

BRASIL - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RDC Nº 20, DE 5 DE MAIO DE 2011. Acessado em 13/09/2018.

<<http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf>>

BRASIL - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Interpretação de dados microbiológicos. IV Realização do teste. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/realizacao_testes2.htm> Acessado em 31.05.2018.

BRITO U.M.B., SOUZA L.M., LEITE P.A.G., RIBEIRO A.R.P. Detecção de resíduos de substâncias com ação antimicrobiana nos leites UAT e pasteurizado comercializados no município de Itabuna-Bahia. Veterinária e Zootecnia 23(1): 123-130, 2016.

CATÃO, R.M.R., CEBALLOS, B.S.O. *Listeria SPP.*, Coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). Ciências Tecnologia de Alimentos, v.21, p.281-287, 2001.

CAMPOS, A. C.L.P. DE; PUNO-SARMIENTO, J. J.; MEDEIROS, L. P.; GAZAL, L. E. S.; MALUTA, R. P.; NAVARRO, KOBAYASHI, A. R. K.T.; FAGAN, E. P.; NAKAZATO, G. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. Foodborne pathogens and disease 15 (2): 94-100. 2017.

CANIZALEZ-ROMAN, A., GONZALEZ-NUÑEZ, E., VIDAL, J.E., FLORES-VILLASEÑOR, H., LEÓN-SICAIROS, N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. International Journal of Food Microbiology, 164, 36–45, 2013.

CARDOSO, P. A., MARIN, J. M. Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de shiga toxina em queijo mussarela produzido artesanalmente. Ars Veterinária, Jaboticabal, SP, v.30, n.2, 104-108, 2014.

CARVALHO, G. Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. Circular Técnica. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p. 2, Juiz de Fora - MG, 2010.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese (Final Update). 2010.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts (Final

Update), 2014. Acessado em 05.12.17 <<https://www.cdc.gov/ecoli/2014/o121-05-14/index.html>>

CERVEIRA, F. A.; MATHIAS, J. B.; CASANOVA, Y. S.; LOPES, B. M. T.; MOREIRA, F. K.; FAGANELLO, J.; WOBETO, A. P.; KOERICH, P. K. V.; MARQUES, E. K.; FONSECA, A. S. K.; LUNGE, V. R.; IKUTA, N. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* através da PCR em tempo real. Revista de Iniciação Científica da ULBRA, p 27 – 34, 2008

CESTARI, S. E., SCHUROFF, P. A., LIMA, N. R., BURGOS, T. N., DAMBROZIO, A. M. L., PELAYO, J. S. Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. v. 15, n. 2, p. 139-143, 2016

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. EUA. 2014. (M100-S24). p. 44 - 50 EUA. 2015. (M100-S25).

ANA ÍRIS MENDES COELHO, A. I. M.; MILAGRES, R. C. R. M., MARTINS, J. DE F. L.; AZEREDO, R. M. C. DE; SANTANA, A. M. C. Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. Ciência & Saúde Coletiva, 15(Supl. 1):1597-1606, 2010.

COURA, F. M., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. Pesquisa Veterinária Brasileira vol.34 no.9 Rio de Janeiro, 2014.

DIAS, M. T.; Bricio, S. M. L.; Almeida, D. O.; Oliveira, L. A. T.; Filippis, I. de; Marin, V. A. Caracterização molecular e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de cepas enteropatógenicas de *E. coli* (EPEC), isoladas de queijo minas frescal. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2012, vol.32, n.4, pp.747-753, 2012

DIAS, R.C.B., DOS SANTOS, B.C., DOS SANTOS, L.F., VIEIRA, M.A., YAMATOGLI, R.S., MONDELLI, A.L., SASATSUNE, T., SFORCIN, J.M., GOMES, T.A.T., HERNANDES, R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. Acta Pathologica, Microbiologica. 10.1111/apm.12501, p. 299 – 308, 2016.

EL-BADAWY M. F., TAWAKOL W. M., MAGHRABI I. A., MANSY M. S., SHOHAYEB, M. M. E.; ASHOUR M. S. Detecção Iodométrica e Molecular da Produção de ESBL Entre os Isolados Clínicos de *E. coli* Impressões Digitais por ERIC-PCR: O

Primeiro Relatório Egípcio Declara o Surgimento da *E. coli* O25b-ST131clone Harboring *bla*_{GES}. Resistência Microbiana às Drogas. P. 703 – 717. Volume: 23 Edição 6: Cairo, 2017.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S., SANTOS, G. C. F., SOUZA, J. S., BERNARDES, F. S., SILVA, I. P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal. v.10, n.1, p. 55 - 67, 2016.

FDA, U.S. Food and Drug Administration, 2015. Antimicrobial Resistance. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/ucm2006489.htm> Acessado em 23/03/2016.

FONSECA, C. R.; PORTES, R. DE G.; FREGONESI, R. P.; QUEIROZ, S. R. A.; GODOY, S. H. S.; MUNIN, F. S.; PORTO, E.; SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M.; "Ocorrência de *Escherichia coli* Potencialmente Causadoras de Toxi-Infecções Alimentares em Linhas de Processamento de Queijo Minas Frescal", p. 175-176. In: Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene [=Blucher Food Science Proceedings, v.1, n.1]. São Paulo: Blucher, 2014.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2 ed. Artmed, p.221- 235, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 27 - 30, 2004.

GHATAK, S., SINGHA, A., SEN A, GUHA C, AHUJA A, BHATTACHARJEE U, DAS S, PRADHAN NR, PURO K, JANA C, DEY TK, PRASHANTKUMAR KL, DAS A, SHAKUNTALA I, BISWAS U, JANA PS. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitic milk samples. Transboundary and Emerging Diseases, v.60, n.5, p.385-9, 2013.

GIRON, J. A., HO, A. S. Y., SCHOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science. 254, 710 – 713, 1991.

GONÇALVES, E. S., MARQUES, M. H. M., LUCCA, P. S. R. A segurança alimentar e os consumidores: Um breve estudo sobre a *Escherichia coli*. v 7, n 1, 2002.

GONÇALVES, P.; SILVA, H.. Boas práticas de fabricação (BPF): aplicação em uma indústria de embalagens alimentícias. Revista de Administração da UNIFATEA, América do Norte, 1 2 04 2009.

GOODMAN & GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1176 – 1351, 2001.

GUILLÉN, L.; MILLÁN, B. ARAQUE, A. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. Volume 18, Issue 3, p. 100-108, 2014.

GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L.S., PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, vol.33, n.3, p. 667 – 679, São Paulo, 2010

GYLES, C.L., FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: Gyles CL, Prescott JF, Thoen CO (Eds.), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Blackwell Publishing, Ames, p.267-308, 2010

HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v.87, p.867-876, 1999.

JARLIER, V., NICOLAS, M. H., FOURNIER, G., PHILIPPON, A. Extended broad spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer betalactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, v.10, n.4, p.867-878, 1988.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Artmed. 566-569, Porto Alegre, 2005.

KAZAMA, D. C. S.; KAZAMA, R. Contaminantes em alimentos de origem animal: leite e carne de bovinos. *Ciências agrárias: ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária*, Capítulo 5, p 111, 2017.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHERENKENBERGER, P. C., WINN, W. C. JR. Diagnósticomicrobiológico. 5ª Edição, 2001.

KORNACKI, J. L., JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. American Public Health Association Washington, 4th edition, p.69-82, 2001.

KYAW, C.M.; DE ARAUJO, C.R.; LIMA, M.R.; GONDIM, E.G.S.; BRIGIDO, M.M.; GIUGLIANO, L.G. Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). *Infection, Genetics and Evolution* 3, 111–117, 2003.

KUMARASAMY K.K., TOLEMAN M.A., WALSH T.R., BAGARIA J., BUTT F., BALAKRISHNAN R., CHAUDHARY U., DOUMITH M., GISKE CG, IRFAN S., et al. Emergência de um novo mecanismo de resistência a antibióticos na Índia, Paquistão e Reino Unido: Um estudo molecular, biológico e epidemiológico. *Lancet Infect. Dis.*; 10 : 597-602. 2010.

LOUREIRO, R. J., ROQUE, F., RODRIGUES, A. T., HERDEIRO, M. T., RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de saúde pública*. 34(1):77–84. 2016.

MAGRAY, M. S. U. D., KUMAR, A. RAWAT, A. K., SRIVASTAVA, S. Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. *Bioinformation*. 6(10): 370–371, 2011.

MELLMANN, A., HARMSSEN, D., CUMMINGS, C. A., ZENTZ, E. B., LEOPOLD, S. R., RICO, A., PRIOR, K., SZCZEPANOWSKI, R., JI, Y., ZHANG, W., MCLAUGHLIN, S. F., HENKHAUS, J. K., LEOPOLD, B., BIELASZEWSKA, M., PRAGER, R., BRZOSKA, P. M., MOORE, R. L., GUENTHER, S., ROTHBERG, J. M., KARCH, H. Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *Plos one*. Volume 6, p. 2 - 8, 2011.

MENEGARO, A.; FLORES, A. F.; SIMER, P.; SILVA, F. E. DA; SBARDELOTTO, P. R. R.; PINTO, E. P. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. *Scientia Agraria Paranaensis*. Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 2, abr./jun., p. 171-174, 2016.

MINBIOLE, K. P. C. et al. From antimicrobial activity to mechanism of resistance: the multifaceted role of simple quaternary ammonium compounds in bacterial eradication. *Tetrahedron*, v. 72, p. 3559–3566, 2016.

MORAES, A. L.; ARAÚJO, N. G. P.; BRAGA, T. L. Automedicação: revisando a literatura sobre a resistencia bacteriana aos antibioticos. *revista eletrônica estágio saúde*. Volume 5, Número 1, p. 122 – 132. 2016.

MOTTIN, V. D.; SILVA, L. L.; ROCHA, J. N.; TEIXEIRA NETO, M. R. Quantificação e correlações de parâmetros microbiológicos em queijos minas frescal no sudoeste da Bahia. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 19, n. 3, p. 137-142, jul./set. 2016.

MULLER, D., GREUNE, L., HEUSIPP, G., KARCH, H., FRUTH, A., TSCHÄPE, H. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli*

isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Applied Environmental Microbiology*.73:3380–90, 2007.

MURRAY, P., ROSENTHAL, K. E PEALLER, M. Medical Microbiology. Fifth edition. Elsevier Mosby, USA, 2005.

NAGY, B., SZMOLKA, A., SMOLE MOŽINA, S., KOVAČ, J., STRAUSS, A., SCHLAGER, S., BEUTLICH, J., APPEL, B., LUŠICKY, M., APRIKIAN, P., PÁSZTI, J., TÓTH, I., KUGLER, R., WAGNER, M. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *International Journal of Food Microbiology*, 16;209:52-9, 2015.

NATARO, J.P. & KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:142-201, 1998.

O'CONNOR, C.; PHILIP, R. K.; KELLEHER, J. The first occurrence of a CTX-M ESBL-producing *Escherichia coli* outbreak mediated by mother to neonate transmission in an Irish neonatal intensive care unit. *BMC Infectious Diseases*., Volume 17, Number 1, p. 1, 2017

OKURA, M. H. & MOACIR, J. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de queijos minas frescal produzidos com leite cru, leite pasteurizado e de queijo temperado em alguns municípios da região do triângulo mineiro. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 65, 33-42. 2010.

OLIVEIRA, M. A.; TAKAMURA, A. E.; ARIAS VIGOYA, A. A., ARAÚJO, F.E. Enterobacteriaceae: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – revisão de literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária - Ano XIII*, n 25, 2015

OLIVEIRA, A. M.; KURIHARA, RICARDO, Y.; SILVA, F. F. DA; SILVA, F. DE G.; JÚNIOR, J. C. R.; BELOTI, V. Condições higiênico-sanitárias da produção de queijos tipo mussarela e minas frescal comercializados no norte do Paraná. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 72, n. 1, p. 40-47, 2017.

OLTRAMARI, K.; CARDOSO, R. F.; PATUSSI, E. V.; SANTOS, A. C. B.; MIKCHA, J. M. G. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* isolated from pasteurized milk in State of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences* vol.50 no.2, p. 337 – 334. São Paulo, 2014

PATON, A.W., PATON, J.C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic

E. coli hlyA, *rfbO111*, and *rfbO157*. Journal of Clinical Microbiology, v.36, n.2, p.598-602, 1998.

PEACH, K. C., BRAY, W. M., WINSLOW, D., LININGTON, P. F., LININGTON, R. G. Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis. The Royal Society of Chemistry. Mol. BioSyst, 9, 1837—1848, 2013.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella sp.* em queijo Minas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.51, n. 5, Belo Horizonte, out. 1999.

PESSANHA, R.P., FILHO, P.P.C. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia, v.53 n.1, 2001.

PINHEIRO, M. P.; WADA, T. C.; PEREIRA, C. A. M. Análise Microbiológica de Tábua de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos, SP. Rev. Simbio-Logias, v.3, n.5, 2010.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol, v. 300, n. 6, p. 371-379, 2010.

QUINN, P.J., MARKEY, B., CARTER, M.E., DONNELLY WJ, LEONARD FC. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Ed. Artmed. P.512, Porto Alegre, 2005.

RANTALA, M.; LAHTI, E.; KUHALAMPI, J.; PERSONEM, S.; JÄRVINEN, A. K.; SAIJONMZA AKOULUMIES, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. Acta Veterinaria Scandinavica, Copenhagen, v. 45, n. 1-2, p. 37-45, 2004.

REBELLO, R. C. L. Características biogenéticas e de resistência ao mercúrio em amostras de *Escherichia coli* isoladas de sistemas aquáticos no Rio de Janeiro. Fiocruz, 2012.

REID, S.D., BETTING, D.J., WHITTAM, T.S. Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. Journal of clinical microbiology, p. 2719–2722, 1999.

SANDRINI, C. N. M., PEREIRA, M. A., BROD, C. S., CARVALHAL, J. B., ALEIXO, J. A. G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v 37, n1, p 175 – 182, 2007.

SANTOS, V. A. Q., HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 69(1):38-46, 2010.

SCHMIDT, H., KNOP, C., FRANKE, S., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J., KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.3, p.701-705, 1995.

SCHULTSZ, C., POOL, G.J., KETEL, R., WEVER, B., SPEELMAN, P., DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.10, p.2393-2397, 1994.

SETHABUTR, O., VENKATESAN, M., MURPHY, G.S., EAMPOKALAP, B., HOGE, C.W., ECHEVERRIA, P. Detection of Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *The Journal of Infectious Diseases*, v.167 p.458–461, 1993.

SHAIKH, S.; FÁTIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M.; KAMAL, M.A. Resistência a antibióticos e beta-lactamases de espectro alargado: tipos, epidemiologia e tratamento. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22, p. 90–101, Lucknow, 2015

SILVA, M.P, CAVALLI, D.R, OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 26(2): 352-359, 2006.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C.A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: 4ª Editora Varela, p. 295, 2010.

SILVA, M. L. Q. DA; SILVA, G. L.; ADRIANA ANDRADE ARRAES, A. A.; AGUIAR, J. J.; VANDESMET, V. C. S. Avaliação higiênico-sanitária dos restaurantes self-services e restaurantes populares da cidade de Juazeiro do Norte (CE) quanto a prevalência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.* *Revista Interfaces*. Ano 2. Vol. 2, Número Especial, 2014.

SILVA, F.F; RIBEIRO JUNIOR, J.C; GARCIA, L. N. H; OLIVEIRA, A. M; SILVA, F. G; AUGUSTO, A. N; TEIDER JUNIOR, P. I; BELOTI, V. Pesquisa de genes de virulência de *Escherichia coli* isoladas de leite cru refrigerado da região central do Paraná. I Congresso de Pesquisa Animal e Humana, Londrina - PR 2016

SILVA, H. R. A. DA, BONIFÁCIO, M. A. DE S., OLIVEIRA, M. S. C. DE, ELLER, L. K. W. Avaliação dos genes de virulência e formação dos biofilmes em *Escherichia coli* isoladas em um laboratório clínico de Presidente Prudente/SP. *Colloquium Vitae*, v. 9 n.3 p. 13 – 23. América do Norte, 2018.

SILVA, C. R. Marcadores fenotípicos e genotípicos de resistência aos antimicrobianos em bactérias gram-negativas de queijo minas frescal. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, p. 34 – 52. Rio de Janeiro, 2018.

SOUZA, C.O.; Melo, T. R. B.; Melo, C. do S. B.; Menezes, E. M.; Aline Correa de Carvalho, A. C. de; Monteiro, L. C. R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. *Revista Pan-Amazônica de Saude*, 7(2):79-91, 2016.

SOUZA, I. A.; Giovannetti, A. C. da S.; Santos, L. G. de F.; Gandra, S. O. da S.; Martins, M. L.; Ramos, A. de L. S. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado na zona da mata mineira. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 72, n. 3, p. 152-162, 2017.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 897. 2006.

SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA, 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acessado em 20.10.2015.

SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acessado em 07.02.2018.

TAMANG, M. D.; NAM, H. M.; GURUNG, M.; JANG, G. C.; KIM, S. R.; JUNG, S. C. Molecular characterization of CTX-M -lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment. *Applied Environmental Microbiology*. 79:3898 - 905, 2013.

THOMSON, K. S. AND MOLAND, E. S. Antimicrobial agents and chemotherapy, American Society for Microbiology. p. 3548–3554 vol. 45, no. 12, 2001.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, v.41, n.6, p.2669-2671, 2003.

TOMA, C., LU Y, HIGA, N., NAKASONE, N., CHINEN, I., BASCHKIER, A., RIVAS, M., IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, v.41, n.6, p.2669-2671, 2003.

TRABULSI, L R., ALTERTHUM, F. Microbiologia 4 ed. Atheneu, p. 269 - 276, 2005

VIDAL, M., KRUGER, E., DURÁN, C., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, VALERIA., TORO, C., VIDAL, R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. Journal of clinical microbiology, p. 5362–5365, 2005.

WHO, World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance – Global Report of Surveillance. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
Acessado em: 21/03/2016.

WHO, World Health Organization. 2017. One Health. Acessado em 21.09.18. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/one-health/en/>>

WHO, World Health Organization, Antibiotic resistance, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> > Acessado em: 31/05/2018