

Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex

[Detection of *E. coli* O157:H7 experimentally inoculated in raw milk samples by conventional method and multiplex PCR]

P.M. Garcia¹, E.F. Arcuri^{2*}, M.A.V.P. Brito², C.C. Lange², J.R.F. Brito², M.M.O.P. Cerqueira³

¹Aluno de pós-graduação - EV-UFGM – Belo Horizonte, MG

²Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610

36038-330 – Juiz de Fora, MG

³Escola de Veterinária - UFGM – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Padronizou-se um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) *multiplex* para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 e avaliou-se a eficiência da PCR e de um método de cultivo convencional em placas na detecção desse patógeno experimentalmente adicionado em leite estéril e em leite cru com baixa contagem bacteriana total (média de $4,01 \times 10^3$ UFC/ml) e com alta contagem bacteriana (média de $2,10 \times 10^6$ UFC/ml). Foram padronizadas duas reações de PCR com o uso dos *primers*: "A" (RfbF; RfbR e FLICH7F/FLICH7R) e "B" (SLT-IF/SLTIR e SLT-IIF/SLT-IIR). A detecção de *E. coli* O157:H7 (1UFC/ml) a partir do leite estéril e do leite cru com baixa contaminação bacteriana foi possível quando se utilizou o método de contagem em placas e a PCR. A sensibilidade dos dois métodos foi menor quando se testou o leite cru com alta contaminação microbiana, sendo o método convencional mais sensível. Os resultados indicam que a presença de outros microrganismos, em alta quantidade no leite, dificulta a detecção de *E. coli* O157:H7 pelos métodos utilizados.

Palavras-chave: PCR *multiplex*, *E. coli* O157:H7, antígeno O157, antígeno H7, genes para toxina tipo-shiga

ABSTRACT

This experiment was carried out in order to evaluate the effect of the raw milk bacterial count on the efficiency of a multiplex polymerase chain reaction and a conventional plate count method for detection of Escherichia coli O157:H7. This pathogen was experimentally inoculated into sterile milk, raw milk with low bacterial count (count mean of 4.01×10^3 cfu/ml) and, raw milk with high bacterial count (mean 2.10×10^6 cfu/ml). Two protocols of PCR were standardized using primers "A" (Rfbf and Rfbr and FLICH7F/FLICH7R) and "B" (SLT-IF/SLTIR and SLT-IIF/SLT-IIR). Both conventional plate count and PCR methods were able to detect the presence of E. coli O157:H7 in either sterile milk or raw milk with low bacterial count initially inoculated with 1cfu of E. coli O157:H7 per ml. The sensibility of both methods for high-contaminated raw milk samples was lower, being the conventional approach more sensitive. These results indicate that high bacterial count in raw milk can affect E. coli O157:H7 detection.

Keywords: PCR multiplex, *E. coli* O157:H7, O157 antigen, H7 antigen, shiga-like toxin genes

Recebido em 10 de julho de 2007

Aceito em 3 de junho de 2008

E-mail: edna@cnppl.embrapa.br

para o gene *rfbE*, gerando um produto amplificado de 292 pb; FLIC_{h7}-F 5'-GCGCTGTCGAGTCTATCGAGC-3' e FLIC_{h7}-R 5'-CAACGGTGACTIONTATCGCCATTCC-3' para o gene *fliC* (625 pb); SLT-1F 5'-TGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATAC-3' e SLT-1R 5'-GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC-3' para o gene *slt₁* (210 pb); SLT-IIF 5'-GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCCG-3' e SLT-IIR 5'-GATGCATCTCTGGTCATTG TATTA C-3' para o gene *slt₂* (484 pb). Os genes *rfbE* e *fliC* estão envolvidos na biossíntese dos antígenos somático O157 e flagelar H7, respectivamente, os genes *slt₁* e *slt₂* codificam toxinas semelhantes àquelas produzidas por *Shigella dysenteriae* e estão presentes no grupo de *E. coli* denominado STEC (*Shiga-toxin E. coli*).

A PCR foi realizada por dois diferentes protocolos: (i) em uma única reação, nas condições descritas por Hu et al. (1999), avaliando os quatro pares de primers RfbF/RfbR, FLIC_{h7}F/FLIC_{h7}R, SLT-IF/SLTIR e SLT-IIF/SLT-IIR, utilizando estirpes de *E. coli* O157:H7, e (ii) em duas reações, "A" (com RfbF/RfbR e FLIC_{h7}F/FLIC_{h7}R) e "B" (com SLT-IF/SLTIR e SLT-IIF/SLT-IIR). A reação "A" com 5µl de tampão de PCR (10X), 1µl da mistura de dNTPs (10mM); 1U de taq DNA polimerase; 2,5mmol/l de MgCl₂; 20pmol de cada oligonucleotídeo FLIC_{h7}, 30pmol de cada Rfb, 2,5µl de DNA bacteriano (20ng/µl) e água bidestilada para completar o volume total de 50µl. A reação "B" foi idêntica à reação "A", mas com 50pmol de cada oligonucleotídeo. As misturas "A" e "B" foram aquecidas por cinco minutos a 94°C, submetidas a 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto) e extensão final a 72°C/10min em termociclador³.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,6%, corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) e fotografados em fotodocumentador⁴.

Inicialmente um cultivo de *E. coli* O157:H7 (IAL 1848) foi diluído até a extinção celular (fator de diluição de 10¹²) para determinar as diluições que continham 1000, 100, 10, 1 e 0UFC/ml por meio de contagem em Petrifilm™. Essas mesmas diluições foram utilizadas na avaliação da sensibilidade da PCR para detectar *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em leite esterilizado e leite cru com diferentes contagens de microrganismos contaminantes (baixa e alta contaminação definidas pela contagem bacteriana total - CBT) após enriquecimento em caldo EC.

Diluições decimais de uma cultura de *E. coli* O157:H7 crescida em caldo BHI por 24h/35 °C foram feitas, diluindo-se 0,6ml da cultura em 5,4ml de tampão fosfato, até se obter a extinção celular (Fig. 1). Para as diluições com cerca de 100, 10, 1 e 0UFC/ml foi feito plaqueamento em duplicata de 1ml/placas de Petrifilm (para determinar UFC/ml após 24 horas de incubação a 35°C) e inoculação de 1ml em cada três frascos contendo 24ml de leite em pó reconstituído estéril⁵ ou leite cru. Cada um desses volumes de 25ml foi acrescentado em 225ml de caldo EC⁶ com novobiocina, (100mg/ml)⁷. Incubaram-se os frascos por 24h/35°C e foi realizada a extração de DNA de 1ml da cultura de cada frasco pelo método de lise térmica (Nunes et al., 1999) e pelo método de fenol-clorofórmio (Jersek et al., 1996). O DNA obtido foi usado na PCR *multiplex* (reação "A") para determinar o menor número de bactérias presentes no leite que o método é capaz de detectar. Também foi feito o plaqueamento segundo o método convencional. Para cada tipo de leite o ensaio foi repetido duas vezes visando a analisar a repetibilidade dos métodos de detecção.

O leite cru com baixa contaminação (CBT inferior a 1 x 10⁴UFC/ml) utilizado foi obtido na Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG, e o de alta contaminação microbiana (CBT maior que 1 x 10⁶UFC/ml), no Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, Juiz de Fora, MG.

³GeneAmp PCR System 960, Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA.

⁴Eagle Eye II, Stratagene – La Jolla, EUA.

⁵Molico desnatado, Nestlé – Araçatuba, Brasil.

⁶Difco - Sparks, MD, EUA.

⁷Sigma - St. Louis, MO, EUA.

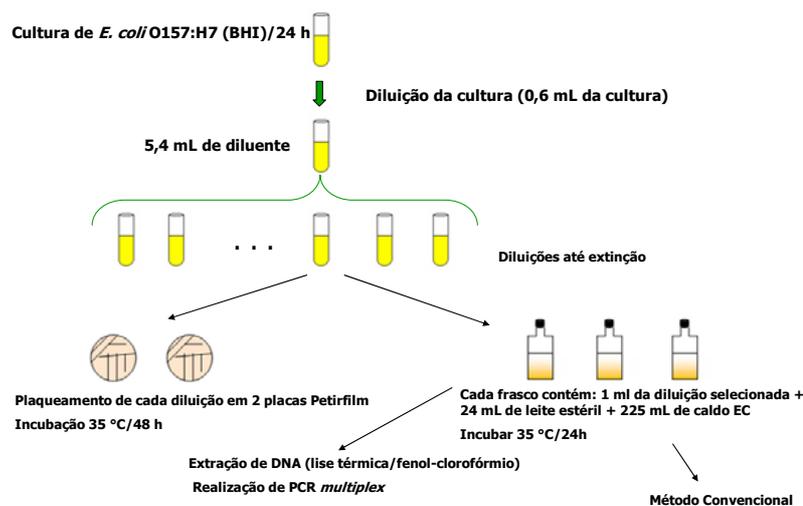


Figura 1. Fluxograma para determinação da sensibilidade da técnica de PCR em detectar *E. coli* O157:H7 em leite esterilizado (110°C/10min), comparando-o com o método convencional em placas.

As mesmas amostras de leite estéril e leite cru (com baixa CBT e com alta CBT) foram inoculadas com *E. coli* O157:H7 e, após enriquecimento em caldo EC a 35°C/24h, foram plaqueadas com alça de 50µl em 12 placas de meio TC-SMAC (com 0,05mg/l de Cefixime-Dynal e 2,5mg/l de telurito de potássio⁸) por inóculo testado e incubadas a 35°C/24h. Uma colônia de cada placa, com morfologia típica de *E. coli* O157:H7 e sorbitol negativa, foi transferida para o meio EC-MUG e incubada novamente por mais 24h a 35°C. Após esse período de incubação, as colônias que não fluoresceram na presença de luz ultravioleta, denominadas colônias MUG negativas, foram testadas com soro anti O157, seguindo as recomendações do fabricante. Aquelas positivas neste teste foram inoculadas em meio de motilidade SIM para posterior teste com soro anti H7⁹ seguindo as recomendações do fabricante. A extração de DNA foi realizada diretamente da colônia em meio EC-MUG (Hu et al., 1999) que foi positiva no teste do soro anti O157.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento, quando se tentou reproduzir a reação de PCR com os quatro pares de *primers* para os genes *rfbE*, *fliC*, *slt₁* e *slt₂*, como proposta

por Hu et al. (1999), não foi verificada a amplificação simultânea dos quatro produtos esperados, mesmo após diversas tentativas de otimização da reação com variação da temperatura de anelamento, das concentrações de MgCl₂ e das concentrações dos *primers*. Entretanto, em misturas separadas, “A” (específica para genes dos antígenos O157 e H7) e “B” (específica para os genes das toxinas SLT-I e SLT-II), nas mesmas condições no termociclador, houve a amplificação dos fragmentos esperados. Os quatro pares de *primers* apresentam tm (*melting temperature*) variando entre 68 e 72°C, o que possibilitou eficiência similar para cada par de *primers* quando testados sob as mesmas condições de temperatura de anelamento. Além disso, os diferentes tamanhos dos produtos de amplificação em cada reação (mistura “A”: 292pb e 625pb e mistura “B”: 210pb e 484pb) facilitaram sua diferenciação em gel de agarose. Os resultados obtidos (Tab. 1) mostram que a PCR multiplex nas duas reações “A” e “B” estabelecidas são suficientes para o diagnóstico de *E. coli* O157:H7. Dentre as bactérias analisadas, apenas *E. coli* O157:H7 apresentou os produtos de amplificação esperados, indicando total especificidade da técnica para detecção de *E. coli* O157:H7, em concordância com o trabalho de Hu et al. (1999).

⁸Dynal Biotech A.S.A – Oslo, Noruega.

⁹Bacto *E. coli* H antiserum H7, Difco – Sparks, EUA.

Detecção de *Escherichia coli* O157:H7...

Tabela 1. Estirpes bacterianas e resultados da PCR

Microorganismo	Número de estirpes testadas	PCR - Número de estirpes positivas			
		H7	O157	SLTI	SLTII
<i>E. coli</i> O157:H7	5	5	5	1	5
<i>E. coli</i> O157 K88ac H11 A2 (IAL 0411)	1	0	1	0	0
<i>E. coli</i> H7 O1 K1 (ATCC 11775)	1	1	0	0	0
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	1	0	0	0	0
<i>E. coli</i> isoladas de mastite	178	2	0	0	0
<i>E. coli</i> enteropatogênica (CNPGL)	5	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium (IAL 1472)	1	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Typhi (IAL 1251)	1	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Dublin (CNPGL 5672)	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (CDC 3430)	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter sakazakii</i> (CDC 7006/7007)	2	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1	0	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i> CIP 6310 (IAL 1585)	1	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19117/SCOTTA)	2	0	0	0	0
<i>Listeria innocua</i> (IAL 1984)	1	0	0	0	0
<i>Listeria welshimeri</i> (IAL 1819)	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (CNPGL 5344)	1	0	0	0	0

Na Fig. 2 mostra-se a eficiência da PCR quando se utilizaram os dois métodos de extração de DNA: fenol-clorofórmio (Jersek et al., 1996) e de lise térmica (Nunes et al., 1999), para leite estéril inoculado com *E. coli* O157:H7, antes e após cultivo de enriquecimento em caldo EC. Uma vez que ambos os métodos de extração de DNA permitiram amplificação dos fragmentos específicos após o cultivo em caldo EC, adotou-se o método de lise térmica devido à sua simplicidade e rapidez.

A sensibilidade e especificidade do método são particularmente importantes quando se analisam alimentos. Para *E. coli* O157:H7, a dose infectante pode ser inferior a 10UFC (Armstrong et al., 1996). Embora não existam padrões microbiológicos estabelecidos para *E. coli* O157:H7 na legislação brasileira, a presença de 1 a 10UFC/ml pode ser capaz de causar doença no homem e, desse modo, não deve ser permitida a sua presença em nenhuma amostra de alimento (ausência em 25g ou 25ml).

O método convencional e o método PCR apresentaram alta sensibilidade na detecção do patógeno, pois este foi detectado quando o inóculo de *E. coli* O157:H7 foi de 1 ou 2UFC, tanto no leite estéril, como no leite com baixo número de microrganismos acompanhantes (Tab. 2 e 3).

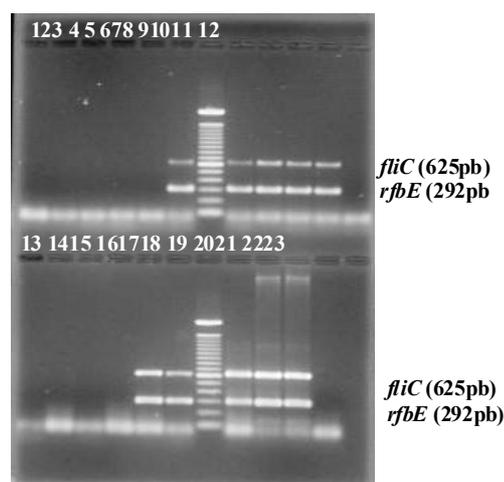


Figura 2. Detecção dos genes *rfb* e *fliC* em *E. coli* O157:H7 inoculada em leite estéril nas concentrações de $2,62 \times 10^4$ UFC/ml, $2,62 \times 10^3$ UFC/ml, $2,62 \times 10^2$ UFC/ml, 37UFC/ml e 4UFC/ml, antes e após enriquecimento em caldo EC, testando dois métodos de extração de DNA (lise térmica e fenol-clorofórmio). Método de lise térmica diretamente do leite: 1 a 5; método de lise térmica após enriquecimento: 6 a 11; método fenol-clorofórmio diretamente do leite: 12 a 16; método fenol-clorofórmio após enriquecimento: 17 a 22; 7 e 19: marcador de peso molecular (100pb); 23: controle negativo.

Tabela 2. Comparação do método convencional e do método PCR na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada até a extinção em leite estéril

Leite estéril	Inóculo de <i>E. coli</i> O157:H7 (UFC)	Convencional			PCR		
		A*	B*	C*	A*	B*	C*
Teste 1	24	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	+	+	-
	0	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-
Teste 2	20	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	-	+	+	-
	0	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-

* A, B e C: repetição.

+: positivo após incubação a 35°C/24h em meio de enriquecimento (Caldo EC).

-: negativo após incubação a 35°C/24h em meio de enriquecimento (Caldo EC).

Tabela 3. Comparação dos métodos convencional e PCR na detecção de *E. coli* O157:H7 experimentalmente inoculada até a extinção, em leite cru com baixa contaminação microbiana

Qualidade microbiológica do leite cru inoculado	Inóculo de <i>E. coli</i> O157:H7 (UFC)	Convencional			PCR		
		A*	B*	C*	A*	B*	C*
Teste 1	Incontável	+	+	+	+	+	+
	170	+	+	+	+	+	+
	CBT: 3,55 x 10 ³ UFC/ml	18	+	+	+	+	+
	Coliformes: 3,90 x 10 ² UFC/ml	2	+	+	+	+	+
		1	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	
Teste 2	Incontável	+	+	+	+	+	+
	237	+	+	+	+	+	+
	CBT: 3,90 x 10 ³ UFC/ml	32	+	+	+	+	+
	Coliformes: 5 x 10 ¹ UFC/ml	2	-	+	+	-	+
		1	-	-	-	-	+
	0	-	-	-	-	-	
Teste 3	Incontável	+	+	+	+	+	+
	223	+	+	+	+	+	+
	CBT: 4,60 x 10 ³ UFC/ml	22	+	+	+	+	+
	Coliformes: 8 x 10 ¹ UFC/ml	3	+	+	+	+	+
		1	+	+	-	+	-
	0	-	-	-	-	-	

CBT: contagem bacteriana total.

* A, B e C: repetição.

+: positivo após incubação a 35°C/24h em meio de enriquecimento (Caldo EC).

-: negativo após incubação a 35°C/24h em meio de enriquecimento (Caldo EC).

No caso do leite cru com alta contaminação bacteriana, a sensibilidade foi menor para os dois métodos, sendo o método convencional mais sensível que a PCR na detecção de *E. coli* O157:H7 (Tab. 4). Estes resultados sugerem que a presença de outros microrganismos em alta quantidade no leite dificulta o desenvolvimento e, conseqüentemente, a identificação de *E. coli* O157:H7, provavelmente por competição por nutrientes.

Hu et al. (1999), ao analisarem amostras de fezes de bovinos, concluíram que, apesar de a presença da microbiota natural da amostra continuar presente no meio de enriquecimento, a PCR *multiplex* não apresentou qualquer reação cruzada com esses microrganismos e que o método de PCR *multiplex* foi tão eficiente quanto o método tradicional de cultivo. Esses resultados são comparáveis aos resultados verificados neste experimento para o leite estéril e para o leite cru de baixa contaminação microbiana.

Detecção de Escherichia coli O157:H7...

Tabela 4. Comparação dos métodos convencional e PCR na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada até a extinção em leite cru com alta contaminação microbiana

Qualidade microbiológica do leite cru inoculado	Inóculo de <i>E. coli</i> O157:H7 (UFC)	Convencional			PCR		
		A*	B*	C*	A*	B*	C*
Teste 1	~20.000	+	+	-	+	+	+
	~2.000	+	+	+	-	-	-
	CBT: 3,19 x 10 ⁶ UFC/ml	-	+	+	-	-	-
	Coliformes: 2,94 x 10 ⁵ UFC/ml	+	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
Teste 2	~28.000	+	+	+	+	+	+
	~2.800	+	+	+	+	+	+
	CBT: 2,10 x 10 ⁶ UFC/ml	+	+	+	+	+	+
	Coliformes: 1,61 x 10 ⁵ UFC/ml	-	+	-	-	-	+
	4	-	+	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
Teste 3	~30.000	+	+	+	+	+	+
	~3.000	+	+	+	+	+	+
	CBT: 1,02 x 10 ⁶ UFC/ml	+	+	+	-	-	-
	Coliformes: 1,63 x 10 ⁵ UFC/ml	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-

CBT: contagem bacteriana total.

* A, B e C: repetição.

+: positivo após incubação a 35°C/24h em meio de enriquecimento (Caldo EC).

-: negativo após incubação a 35°C/24h em meio de enriquecimento (Caldo EC).

Li e Mustapha (2004) testaram a aplicabilidade de uma PCR *multiplex* em alimentos artificialmente contaminados com *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Shigella flexneri* e concluíram que o método pode ser utilizado para detecção desses patógenos em diferentes alimentos. Porém, esses autores verificaram que em alimentos com alta contagem microbiana indígena, como em brotos de alfafa, a sensibilidade do teste ficou muito reduzida.

No método convencional, o teste de soroaglutinação para confirmação do isolado bacteriano como apresentador do antígeno flagelar H7 é um teste extremamente laborioso e demorado, com obtenção dos resultados cerca de 96 horas após o isolamento de colônia típica. Também, *Escherichia hermannii*, que é sorbitol negativa e aglutina em teste com anticorpo O157 de *E. coli*, pode ser isolada de fezes e alimentos como leite cru causando erros de diagnóstico (Borczyk et al., 1987). Assim, neste trabalho realizou-se o método de PCR *multiplex* "A"

(específica para genes dos antígenos O157 e H7) diretamente da colônia bacteriana típica. O DNA bacteriano foi extraído diretamente da colônia por lise térmica (Hu et al., 1999) e a reação de PCR foi feita sob as mesmas condições previamente padronizadas obtendo-se o resultado seis horas após seleção da colônia típica, com total sensibilidade e especificidade. Portanto, quando não se tem conhecimento da CBT do leite cru em análise, deve-se utilizar os dois métodos em conjunto (convencional em placas para isolamento e PCR *multiplex* para identificação de *E. coli* O157:H7), que simplificam e otimizam o trabalho.

Até o presente, nenhum trabalho realizado no Brasil detectou *E. coli* O157:H7 em alimentos (Silveira et al., 1999). No entanto, esse patógeno já foi detectado em rebanhos nacionais (Cerqueira et al. 1999; Gonzalez et al., 2001). Sabendo-se da baixa qualidade da maioria do leite cru produzido no Brasil (Mesquita et al., 2006) e, com base nos resultados obtidos na

presente pesquisa, pode-se questionar se a ausência desse patógeno em leite e derivados analisados no país reflete realmente a ausência ou a dificuldade de seu isolamento quando presente em baixo número em alimentos com alta carga microbiana.

A microbiota considerada normal do leite pode mascarar espécies patogênicas, as quais normalmente estão presentes em baixo número nos alimentos. Em trabalho realizado para determinar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em soro de queijo Cheddar fabricado com leite pasteurizado e não-pasteurizado, Marek et al. (2004) verificaram que o patógeno sobreviveu no soro pasteurizado, em diferentes temperaturas de estocagem, por mais tempo ($P < 0,01$) do que em não pasteurizado, sugerindo efeito inibitório das bactérias ácido-láticas presentes no soro não pasteurizado em *E. coli* O157:H7. Esse efeito da microbiota contaminante pode se tornar crítico quando *E. coli* O157:H7 estiver presente em baixo número nos alimentos.

CONCLUSÕES

O protocolo de PCR para detecção de *E. coli* O157:H7 produtoras de Shiga-like toxinas com a padronização de duas PCR *multiplex* "A" e "B" apresenta total especificidade para detecção de *E. coli* O157:H7 (reação "A") e detecta os genes *slt₁* e *slt₂* (reação "B"), que codificam as toxinas (Shiga-like-toxin 1 e 2), fornecendo informação adicional importante das estirpes identificadas. A capacidade do método de PCR para detecção de *E. coli* O157:H7 varia segundo a contaminação bacteriana inicial do leite cru e é maior no caso de inoculação desse patógeno em leite estéril e leite cru com baixa contaminação microbiana e menor em leite cru muito contaminado. O método de PCR *multiplex* "A" utilizado em substituição à soroaglutinação do antígeno flagelar H7 e somático O157 permite identificação rápida e acurada de colônias típicas em meio seletivo. Para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em leite cru, recomenda-se a utilização do método convencional em placas e do método PCR, e, para leite de excelente qualidade microbiológica (baixa CBT), sugere-se a aplicação da técnica de PCR após a etapa de enriquecimento seletivo; para leite com alta CBT, propõe-se a aplicação da PCR após o isolamento de colônias típicas em meio sólido EC-MUG.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo apoio financeiro (Projeto EDT 2411/05). A Embrapa Gado de Leite (Projeto Prodetab 047-02/99).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, G.J. JR. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.*, v.18, p.29-51, 1996.
- BORCZYK, A.A.; KARMALI, M.A.; LIOR, H. et al. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, v.30, p.98, 1987.
- BOTTERO, M.T.; DALMASSO, A.; SOGLIA, D. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. *Mol. Cell. Probes*, v.18, p.283-288, 2004.
- CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.70, p.111-121, 1999.
- DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J. et al. *Escherichia coli* O157:H7. Foodborne pathogenic bacteria. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington, D.C.: Academic, 1997. p.171-191.
- GONZALEZ, A.G.M.; COUTINHO, C.A.S.; CERQUEIRA, A.M.F. et al. Virulence markers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157 isolated from healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: SBM, 2001. p.104. (Resumo).
- FOODBORNE diseases, emerging. World Health Organization, Janeiro de 2002. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en> Acessado em: 30 out. 2004.

- GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, v.13, p.60-98, 1991.
- HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, v.87, p.867-876, 1999.
- JERSEK, B.; TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N. et al. Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.23, p.55-60, 1996.
- KUNTZ, T.B.; KUNTZ, S.T. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Primary Care Update Ob/Gyns*, v.6, p.192-196, 1999.
- LI Y.; MUSTAPHA, A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR. *J. Food Protec.*, v.67, p.27-33, 2004.
- MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.1117-1123, 2007.
- MAREK, P.; NAIR, M.K.M.; HOAGLAND, T. et al. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. *Int. J. Food Microbiol.*, v.94, p.1-7, 2004.
- MECHIE, S.C.; CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol. Infect.*, v.188, p.17-25, 1997.
- MESQUITA, A.J.; DURR, J.W.; COELHO, K.O. *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p.
- NUNES, E.L.C.; SANTOS, K.R.N.; MONDINO, P.J.J. et al. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v.34, p.77-81, 1999.
- SILVEIRA, N.F.A.; SILVA, N.; CONTRERAS, C. et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brazil. *J. Food Protec.*, v.62, p.1333-1335, 1999.