

## Viabilidade de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) produtoras de toxina Shiga em queijo minas frescal

### Viability of *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC non-O157) Shiga toxin-producing in minas frescal cheese

Paulo Gomes de Lima<sup>\*</sup> Thalita Martins da Silva<sup>II</sup> Luciana Maria Ramires Esper<sup>II</sup>  
Alice Gonçalves Martins Gonzalez<sup>II</sup> Robson Maia Franco<sup>I</sup>

#### RESUMO

A existência de um reservatório animal é de grande importância na transmissão de *Escherichia coli*, produtora de toxina shiga (STEC) aos humanos. Epidemiologicamente, o sorotipo O157:H7 tem sido o mais envolvido em surtos de doença humana causada por STEC, porém surtos envolvendo STEC não pertencentes ao sorogrupo O157 (STEC não-O157) têm sido descritos. Inúmeros trabalhos constatarem uma elevada ocorrência destes microrganismos em fezes de bovinos no Brasil, entretanto, pouco se sabe sobre a transmissão destes aos produtos de origem animal em nosso país. Neste trabalho, foi avaliada a viabilidade de *E.coli* O153:H25; O113:H21 e O111:H8 em Queijo Minas Frescal (QMF), produzido com inóculos de STEC não O157: H7 e armazenados a 8°C. Realizaram-se contagens de *E. coli* e psicotróficos totais após o processamento do queijo e com intervalos de sete e quinze dias. Foi observado aumento nas contagens de *E. coli* STEC não O157: H7 e psicotróficos totais logo após o processamento do QMF, bem como durante o armazenamento a 8°C, temperatura máxima recomendada pela legislação brasileira. Demonstra-se que, caso haja contaminação da matéria-prima com STEC não O157: H7 (deste estudo), o processamento do QMF não elimina os microrganismos e a temperatura máxima recomendada pela legislação não inibe a multiplicação bacteriana, mantendo-se o risco à população. Reforça-se, portanto, a atenção à qualidade da matéria-prima, das ferramentas de qualidade no campo e na indústria de alimentos para garantir a inocuidade do produto final.

**Palavras-chave:** STEC não-O157, queijo minas frescal, toxina shiga.

#### ABSTRACT

The existence of an animal reservoir is of great importance in the transmission of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) to humans. Epidemiologically serotype O157:H7 has

been the most involved in human disease outbreaks caused by STEC, however STEC not belonging to serogroup O157 (STEC non-O157) have been described in outbreaks. Studies have revealed a risk in occurrence of these organisms in feces of cattle in Brazil, but little is known about the transmission to animal's products origin in our country. This study evaluated the viability of *E. coli* O153:H25, O113:H21 and O111:H8 in Minas Frescal Cheese (MFC), produced with non- STEC O157:H7 and stored at 8°C. Counts of *E. coli* and total psychrotrophic were performed after processing and at intervals seven and fifteen days. There were an increase in the counts of *E. coli* and total psychrotrophic just after MFC processing as well as during storage at 8°C. The results demonstrated that, if the raw material (milk) is contaminated with STEC non O157:H7 (this study), the MFC processing does not eliminate the microorganisms and the maximum temperature recommended does not eliminate bacterial growth, keeping the risk to the population. The results reinforces, the attention to the quality of the raw material, the quality tools in the field and in the food industry to ensure the safety of final products.

**Key words:** (STEC non-O157), minas frescal cheese, shiga toxin-producing.

#### INTRODUÇÃO

A existência de um reservatório animal é de capital importância na transmissão de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) aos humanos (PEARCE et al., 2004). Embora alguns trabalhos constatem uma elevada ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em bovinos no Brasil (CERQUEIRA et al. 1997; 1999; GONZALEZ, 2003; TRISTÃO, 2007), pouco se sabe sobre a

<sup>I</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24220-900, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: pglima@id.uff.br.\*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, UFF, Niterói, RJ, Brasil.

transmissão por produtos de origem animal em nosso país, como carne, leite e seus derivados.

Epidemiologicamente, o sorotipo O157:H7 tem sido o mais envolvido em surtos de doença humana causada por STEC (KARMALI, 1989; TARR, 1995; PATON & PATON, 1998). Contudo, surtos envolvendo STEC não pertencentes ao sorogrupo O157 (STEC não-O157) têm sido descritos. Infecções envolvendo STEC não-O157 vêm sendo relatadas em vários países e mais de 50 sorotipos destas STEC têm sido isolados de humanos com colite hemorrágica e Síndrome hemolítica urêmica (SHU) (JOHNSON et al., 1996; CAPRIOLI et al., 2005; LEOTTA et al., 2008).

Algumas estimativas sugerem que STEC não-O157 sejam responsáveis por 25% dos casos de SHU nos EUA (JOHNSON et al., 1996). Em países como Chile (OJEDA et al., 1995), Argentina (LOPEZ et al., 1989) e Austrália (GOLDWATER & BETTELHEIM, 1994), STEC não-O157 são responsáveis pela maioria dos casos de SHU. Cepas STEC não-O157 têm sido frequentemente isoladas de pacientes com diarreia não-sanguinolenta (PIERARD et al., 1990; BROOKS et al., 2005). Na literatura, já foram reportados isolamentos de STEC não-O157 em produtos de origem animal em diversos países (BOSILEVAC & KOOHMARAIE, 2011; FARROKH et al., 2013; MOHAMMED et al., 2014).

Entre os derivados do leite, o queijo é um dos principais produtos, tendo, ademais, alta demanda de consumo. O queijo minas frescal encontra-se entre os queijos mais consumidos no Brasil (LIMA FILHO, 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho visa a avaliar a viabilidade de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) em queijo minas frescal.

## MATERIAL E MÉTODOS

As cepas utilizadas no presente trabalho foram *E. coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157), isoladas de bovino no estado do Rio de Janeiro (GONZALEZ, 2003). A identificação destes microrganismos foi confirmada através de testes bioquímicos e morfológicos. Inóculos de  $10^3$  e  $10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  de cada cepa foram adicionados separadamente em leite do tipo B pasteurizado, utilizado no processamento dos queijos minas frescal. Ao leite aquecido a  $35^\circ\text{C}$ , adicionaram-se 200ppm de  $\text{CaCl}_2$ , e  $0,0625\text{g L}^{-1}$  de coalho Halamix (Chr. Hansen A/S). Uma vez obtido um coágulo firme, foi realizado o corte da massa, com conseqüente liberação de soro.

Procedeu-se à mexedura a  $45^\circ\text{C}$  por 15 minutos. A dessoragem foi realizada manualmente, com o auxílio de peneiras. A salga foi realizada através da adição de sal (2,1%), diretamente na massa do queijo, após a etapa de dessoragem. Após o preparo, estes foram armazenados a  $8^\circ\text{C}$  (FURTADO, 2005). Os leites utilizados como matéria-prima e os queijos não inoculados foram submetidos a análises para verificação de algumas características físico-químicas, como pH, acidez e umidade e dos padrões microbiológicos de *Salmonella* sp, *Estafilococos* coagulase positiva, *Coliformes* termotolerantes e *Listeria* spp, descritos na Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), complementado com análises de psicrotróficos totais. Também foi realizada a pesquisa de *E. coli* O157:H7 no leite (ZADIK et al., 1993), a fim de garantir a ausência deste microrganismo na matéria-prima.

Os queijos foram mantidos a  $8^\circ\text{C}$  e analisados quanto à recuperação de células viáveis de *E. coli* (KORNACKI; JOHNSON, 2001), assim como contagem de psicrotróficos totais (COUSIN et al., 2001) nos tempos de 0 (após o processamento), 7 e 15 dias. Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes, em duplicata.

Após a contagem e isolamento de *E. coli* dos queijos inoculados, realizou-se pesquisa por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dos genes produtores de toxina shiga (*stx1* e *stx2*) (GONZALEZ, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados físico-químicos e microbiológicos obtidos do leite tipo B pasteurizado, a matéria-prima foi considerada em conformidade com os parâmetros legais e de literatura, sendo própria para a elaboração dos queijos. Não foi detectado coliforme a  $45^\circ\text{C}$  e *E. coli* O157:H7 nas amostras de leite, assegurando que os microrganismos enumerados no experimento não foram oriundos da matéria-prima utilizada. As análises físico-químicas dos queijos não inoculados apresentaram valores médios de umidade 58%, pH 6,6 e acidez 0,11%. Os valores de umidade, pH e acidez estavam em conformidade com os padrões oficiais de queijo Minas Frescal (BRASIL, 1996, BRASIL, 2006). Não foram observadas contagens de *E. coli* e a contagem de psicrotróficos variou de  $3,6 \times 10^4$  UFC  $\text{g}^{-1}$  a  $5,0 \times 10^5$  UFC  $\text{g}^{-1}$ .

Os leites inoculados com a cepa O153:H25 a  $10^3$ UFC  $\text{ml}^{-1}$  apresentaram contagem média de  $3,8 \times 10^4$  UFC  $\text{g}^{-1}$  após a produção do queijo e  $5,4 \times$

$10^5$ UFC  $g^{-1}$  de psicrotróficos. Nas contagens de sete e quinze dias, as médias foram  $6,5 \times 10^6$ UFC  $g^{-1}$  e  $1,9 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  para *E. coli* e de  $2,7 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  e  $2,2 \times 10^9$ UFC  $g^{-1}$  para psicrotróficos, respectivamente (Figura 1).

Já os leites inoculado a  $10^5$  apresentaram contagem média de  $9,8 \times 10^6$  após a produção do queijo e  $4,0 \times 10^6$ UFC  $g^{-1}$  de psicrotróficos totais. Nas contagens de sete e quinze dias, as médias foram  $1,9 \times 10^7$  e  $2,2 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  para *E. coli* e de  $2,2 \times 10^9$  e  $3,6 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$  para psicrotróficos totais, respectivamente (Figura 2).

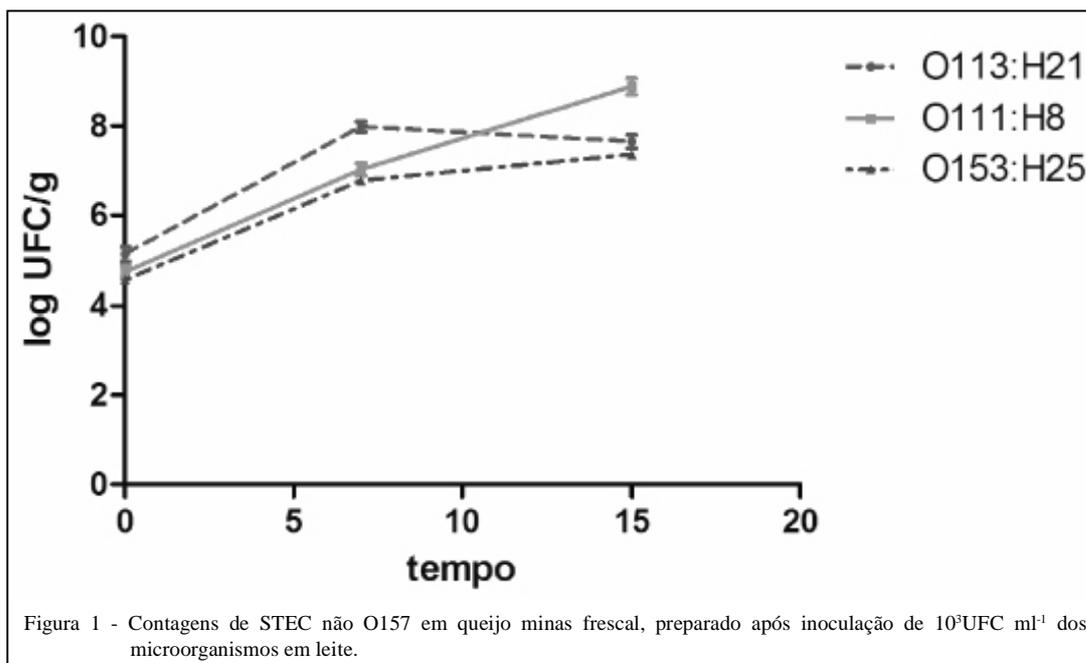
Os leites inoculados com a cepa O113:H21 à  $10^3$  apresentaram contagem média de  $9,5 \times 10^4$ UFC  $g^{-1}$  de *E. coli* após a produção do queijo e de  $2,2 \times 10^6$ UFC  $g^{-1}$  de psicrotróficos totais. Nas contagens de sete e quinze dias, as médias foram de  $7,5 \times 10^7$  e  $6,4 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  para *E. coli* e de  $7,4 \times 10^8$  e  $6,1 \times 10^8$ UFC  $g^{-1}$  psicrotróficos totais, respectivamente. Os leites inoculados a  $10^5$  desta cepa apresentaram contagem média de  $5,7 \times 10^6$ UFC  $g^{-1}$  após a produção do queijo e  $6,6 \times 10^6$ UFC  $g^{-1}$  de psicrotróficos totais. Nas contagens de sete e quinze dias, as contagens médias foram de  $5,5 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  e  $9,2 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  para *E. coli* e de  $7,6 \times 10^8$ UFC  $g^{-1}$  e  $1,1 \times 10^9$ UFC  $g^{-1}$  para psicrotróficos, respectivamente.

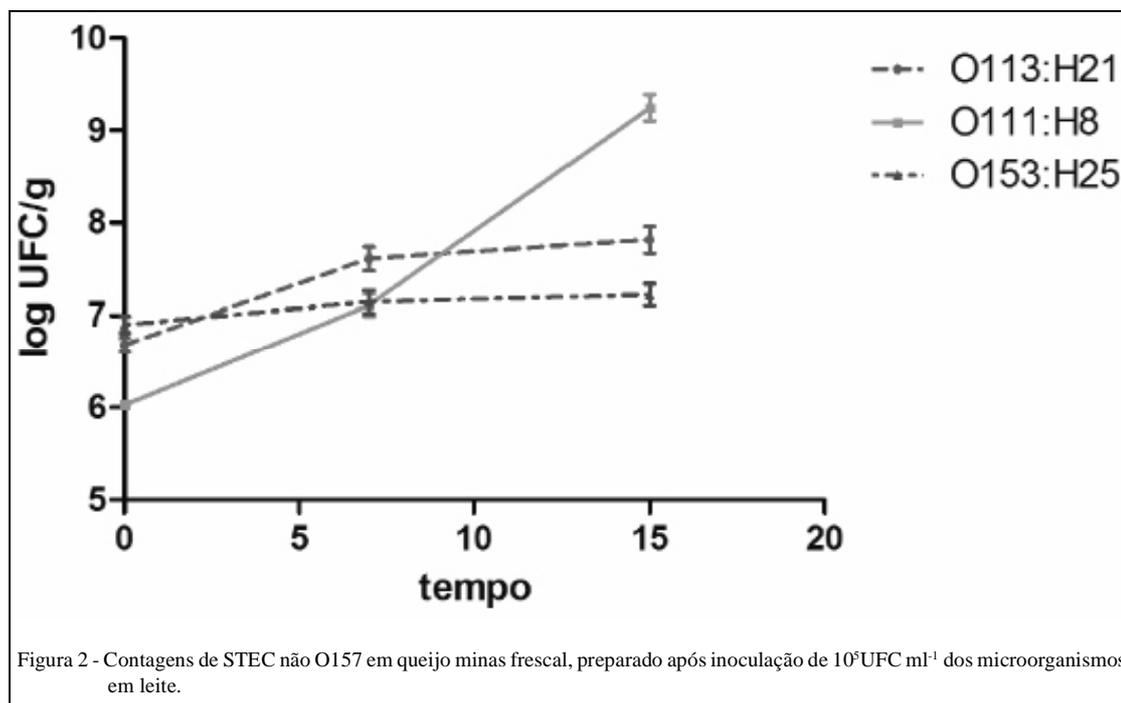
Os leites inoculados com a cepa O111:H8 a  $10^3$  apresentaram contagem média de  $7,6 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  de *E. coli* após a produção do queijo e de  $2,5 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  de psicrotróficos totais.

Nas contagens de sete e quinze dias, as médias foram  $1,5 \times 10^7$  e  $1,2 \times 10^9$ UFC  $g^{-1}$  para *E. coli* e de  $1,8 \times 10^8$ UFC  $g^{-1}$  e  $3,6 \times 10^{10}$  UFC  $g^{-1}$  para psicrotróficos totais, respectivamente. Os leites inoculados a  $10^5$  apresentaram contagem média de  $1,2 \times 10^6$ UFC  $g^{-1}$  após a produção do queijo e  $4,1 \times 10^4$ UFC  $g^{-1}$  de psicrotróficos totais. Nas contagens de sete e quinze dias, as médias foram  $1,7 \times 10^7$ UFC  $g^{-1}$  e  $2,5 \times 10^9$ UFC  $g^{-1}$  para *E. coli* e de  $1,0 \times 10^8$ UFC  $g^{-1}$  e  $3,1 \times 10^{10}$  para psicrotróficos totais, respectivamente. Todos os isolados selecionados foram positivos para os genes produtores de toxina.

São escassos os relatos na literatura sobre o comportamento de STEC não-O157 sob condições que controlam o desenvolvimento microbiano em alimentos, apesar de terem sido relatadas como importante agente etiológico de doenças em humanos, em algumas regiões do mundo (PATON & PATON, 1998; BRETT et al., 2003). No Brasil, esse sorotipo tem sido isolado com considerável frequência em fezes bovinas (GONZALEZ, 2003; IRINO, 2005).

Em relação a *E. coli*, o aumento na contagem logo após o processamento do queijo demonstra que temperaturas de processamento do QMF ( $35^\circ$  e  $42^\circ$ C) favorecem a atividade microbiana durante o tempo de processamento. Durante o tempo de armazenamento, houve aumento da produção microbiana mesmo a  $8^\circ$ C, temperatura máxima recomendada pela legislação brasileira (BRASIL, 1997), portanto a temperatura de  $8^\circ$ C, para o armazenamento do produto, não foi





suficiente para inibir a multiplicação da cepa do presente estudo. A temperatura de armazenamento é um ponto crítico para a segurança do produto, assim como a higiene de toda cadeia produtiva do QMF, já que este caracteriza-se por ser um produto de alta umidade, a ser consumido fresco. Testes preliminares realizados, em meio de cultivo TSB, com o microorganismo em questão à temperatura de 4°C, pH 5,5 e pH 7,0 demonstraram que, apesar de ter células viáveis, houve uma redução da contagem microbiana em relação ao inóculo de até dois ciclos logarítmicos em 7 e 15 dias, sinalizando, portanto, que trabalhos futuros devem ser realizados em QMF para verificar limites seguros de temperatura, podendo levar à revisão dos limites máximos de temperatura recomendados pela legislação.

## CONCLUSÃO

Demonstra-se que, caso haja contaminação da matéria-prima com STEC não O157 (deste estudo), o processamento do QMF não elimina os microorganismos e a temperatura máxima recomendada pela legislação não inibe ou elimina o crescimento bacteriano, mantendo-se o risco à população. Reforça-se, portanto, a atenção à qualidade da matéria-prima, das ferramentas de qualidade no campo e na indústria de alimentos para garantir a inocuidade do produto final.

## REFERÊNCIAS

- BOSILEVAC, J.M.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied Environmental Microbiology*, v.77, p.2103-2112, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC, nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 05 nov. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de 1996. seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 05 nov. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 08 de setembro de 1997, seção 1, p.19684. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1220>>. Acesso em: 05 nov. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 14 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos

- Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro 2006, Seção 1, p. 8. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 05 nov. 2013.
- BRETT, K.N. et al. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2-EDL933* and/or *stx2vhb* subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. v.41, p.2716-2722, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791914>>. Acesso em: 08 dez. 2013.
- BROOKS, J.T. et al. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983-2002. **Journal of Infectious Disease**, v.192, p.1422-1429, 2005. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/30087559?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21103139523381>>. Acesso em: 2 dez. 2013.
- CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Researches**, v.36, p.289-311, 2005. Disponível em: <<http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/90/29/71/PDF/hal-00902971.pdf>>. Acesso em: 3 dez. 2013.
- CERQUEIRA, A.M.F. et al. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from raw beef product in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal Food Protection**, v.60, p.177-180, 1997. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1997/00000060/00000002/art00015>>. Acesso em: 03 dez. 2013.
- CERQUEIRA, A.M.F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle at Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, p.111-121, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00123-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00123-6)>. Acesso em: 03 dez. 2013.
- COUSIN, M.A. et al. Psychrotrophic microorganisms. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington, 2001. Cap.13, p.159-166.
- FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p.190-212, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939912>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005. 200p.
- GOLDWATER, P.N.; BETTELHEIM, K.A. The role of enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes other than O157:H7 as causes of disease. In: KARMALI, M.A.; GOGLIO, A.G. (Eds.). **Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. p.57-60. (Excerpta Medica International Congress Series 1072).
- GONZALEZ, A.G.M. **Características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Rio de Janeiro**. 2003. 199f (Tese de Doutorado)- Pós-graduação em Microbiologia, IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.
- IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.29-36, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607081>>. Acesso em: 04 dez. 2013.
- KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p.15-38, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358098/>>. Acesso em: 01 dez 2013.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington, 2001. Cap.8, p.69-82.
- LEOTTA, G.A. et al. Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Austrália and New Zealand. **Bmc Microbiology**, v.8, p.46, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/46>>. Acesso em: 02 dez. 2013.
- LIMA FILHO, R.R. **Aumenta o consumo de queijo no Brasil**. 2010. Carta Leite, Bebedouro, Set de 2010. Disponível em: <[http://www.bovinos.ufpr.br/100921\\_Aumenta\\_o\\_consumo\\_de\\_queijo\\_no\\_brasil\\_def.pdf](http://www.bovinos.ufpr.br/100921_Aumenta_o_consumo_de_queijo_no_brasil_def.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2014.
- LOPEZ, E.L. et al. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South American. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN A.D. (Eds.). ***Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains**. Washington, DC: ASM, 1998. p.30-37.
- MOHAMMED, M.A. et al. Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. **Food Control**, v.25, p.159-164, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513004817>>. Acesso em: 10 apr. 2014.
- OJEDA, A. et al. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2199-2201, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559979>>. Acesso em: 02 dez. 2013.
- PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.450-479, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665978>>. Acesso em: 02 dez. 2013.
- PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eae*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb0111*, and *rfb0157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.598-602, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466788>>. Acesso em: 08 dez. 2013.
- PEARCE, M.C. et al. Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.1708-1716, 2004. Disponível em: doi: 10.1128/AEM.70.3.1708-1716.2004. Acesso em: 04 dez. 2013.
- PIERARD, D. et al. Results of screening for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in faeces in Belgium. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.9, n.3,

p.198-201, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2186912>>. Acesso em: 05 dez. 2013.

TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. **Clinical Infectious Disease**, v.20, p.1-10, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727633>>. Acesso em: 02 dez. 2013.

TRISTÃO, L.C.S. et al. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup

O111 isolated from cattle. **Veterinary Microbiology**, v.119, p.358-65, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049189>>. Acesso em: 02 dez. 2013.

ZADIK P.M. et al. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, v.39, p.155-158, 1993. Disponível em: <[http://jmm.sgmjournals.org/content/39/2/155.abstract?ijkey=dc61d48776cdaab7734a4c11d33f260f007da8a7&keytype=tf\\_ipsecsha](http://jmm.sgmjournals.org/content/39/2/155.abstract?ijkey=dc61d48776cdaab7734a4c11d33f260f007da8a7&keytype=tf_ipsecsha)>. Acesso em: 02 out. 2011.