

ESCHERICHIA COLI, PRODUTORAS DE SHIGATOXINAS DETECTADAS EM FEZES DE BOVINOS LEITEIROS

H.I.G. Vicente, L.A. do Amaral, A.P. Nunes, C.S. Lorenzon

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: isahinig@yahoo.com.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *Escherichia coli* produtoras de Shigatoxinas (STEC) e *E. coli* dos sorogrupos O157, O111 e O113 em rebanhos leiteiros do Município de Jaboticabal, SP, Brasil. A presença de sequências gênicas *stx*₁, *stx*₂ e *eae* foi detectada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de fezes. Todas as amostras *stx* e *eae* positivas foram submetidas a uma nova reação de PCR para detecção das sequências *rfb* O157, O111 e O113. Observou-se uma alta prevalência (72,16%) de sequências *stx* nas fezes dos bovinos, sendo que o perfil genotípico encontrado com maior frequência foi o *stx*₁ associado à *stx*₂. Os coeficientes de prevalência das sequências *rfb* O157, O111 e O113 foram, respectivamente, 14,77%, 0,2% e 30,83%. Animais de todos os rebanhos (100%) apresentaram em suas fezes STEC e *E. coli* O113 e os sorogrupos O157 e O111 foram observados em 60,0% e 10,0% dos rebanhos, respectivamente. Concluiu-se que a alta prevalência de STEC detectada em rebanho leiteiro evidenciada nas fezes de bovinos desempenham um papel importante na contaminação ambiental e podem oferecer risco de agravo à saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Shigatoxigênica, prevalência, *E. coli* O157, *E. coli* O111, *E. coli* O113.

ABSTRACT

SHIGATOXIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* DETECTED IN DAIRY CATTLE FECES. The purpose of this study was to determine the prevalence of Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) and serogroups O157, O111 and O113 in dairy cattle from Jaboticabal, state of São Paulo, Brazil. Feces samples were collected from 10 herds and assessed for the presence of the virulence genes *stx*₁, *stx*₂ and *eae* by polymerase chain reaction (PCR). All samples positive for *stx* and *eae* were submitted to a second PCR reaction targeting the sequences *rfb* O157, *rfb* O111 and *rfb* O113. A high prevalence of *stx* (72.16%) was detected in the fecal samples, the most frequent being *stx*₁ associated to *stx*₂. The prevalence of sequences *rfb* O157, *rfb* O111 and *rfb* O113 was 14.77%, 0.2% and 30.83%, respectively. STEC and serogroup O113 was identified in all herds (100%), and serogroups O157 and O111 were observed in 60% and 10% of the herds. In conclusion, the high STEC prevalence detected in dairy herds evidences that bovine feces might play an important role as a contamination source in the region of Jaboticabal.

KEY WORDS: Shigatoxigenic, prevalence, *E. coli* O157, *E. coli* O111, *E. coli* O113.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli fazem parte da microbiota normal do intestino de mamíferos. A maioria delas são comensais inofensivos, entretanto, existem cepas patogênicas e que provocam diarreia (DOYLE *et al.*, 1995). Sabe-se que algumas *E. coli* produzem citotoxinas muito potentes, chamadas Shigatoxina 1 e Shigatoxina 2, e são capazes de aderir à mucosa intestinal (BARRETT *et al.*, 1992).

Dentre as cepas de *E. coli* que produzem Shigatoxinas, classificadas como *E. coli* shigatoxigênicas

(STEC), existem as que são altamente patogênicas aos seres humanos. Estas podem pertencer a uma extensa gama de sorogrupos O, entretanto, particularmente as *Escherichia coli* enterohemorrágicas O157, O111, e mais recentemente O113, parecem ser as responsáveis pela maioria dos casos mais graves (PATON; PATON, 1999). Estes micro-organismos são uma ameaça à saúde pública uma vez que as patologias por eles provocadas são, geralmente, de natureza grave como, por exemplo, a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem

ser fatais, principalmente para crianças e idosos (VOLD *et al.*, 1998).

A transmissão de STEC está frequentemente associada ao consumo de alimentos contaminados, particularmente carne moída e hambúrguer, crus ou mal cozidos (GRIFFIN; TAUXE, 1991). A transmissão de pessoa a pessoa, assim como de animal a pessoa, também é possível (DOYLE *et al.*, 1995; PATON; PATON, 1998).

O reservatório principal das STEC são os bovinos (BLANCO *et al.*, 1993; HANCOCK *et al.*, 1994). STEC podem entrar na cadeia de alimentação humana de várias maneiras, mais frequentemente, por meio da contaminação direta ou indireta da carne, após o abate, com fezes ou conteúdo intestinal contendo o patógeno (PATON; PATON, 1998).

Tendo em vista as informações retro apresentadas, esta pesquisa foi realizada com a finalidade de verificar a prevalência de STEC em rebanhos leiteiros e também de fornecer dados que poderão ser utilizados para melhor direcionar as medidas de controle desses importantes patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foi extraída uma amostra aleatória simples de dez rebanhos, produtores de leite situados no Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. Amostras de fezes de 467 animais foram colhidas no período de estiagem, entre julho e agosto de 2003. A prevalência dos sorogrupos O157, O111 e O113 foi analisada por PCR nas amostras STEC positivas, ou seja, naquelas onde foram detectadas sequências gênicas *stx*₁, *stx*₂ por meio de PCR multiplex.

Os resultados das amostras de fezes foram analisados considerando-se três faixas etárias: bezerros (< 4 meses), novilhas (de 5 meses a 2 anos) e vacas (>2 anos).

Colheita de amostras

As amostras de fezes foram colhidas com suabe retal de todos os bovinos, com ou sem diarreia, de cada propriedade, com exceção de uma, em que foram colhidas amostras dos animais colocados a disposição pelo proprietário. O meio de cultura Cary-Blair (Copan, Itália) foi utilizado para o transporte das amostras (CERQUEIRA *et al.*, 1999), que foram levadas ao laboratório em caixas de material isotérmico, contendo gelo reciclável, sendo processadas imediatamente após a chegada.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Preparo das amostras

Todas as amostras colhidas foram semeadas em superfície de placas contendo ágar cistina lactose eletrólito deficiente (CLED - Difco, France) e levadas à incubação a 37° C por 18-24h., para obtenção de crescimento confluyente. Após esse período, o crescimento polimicrobiano foi coletado em aproximadamente 2 mL de tampão fosfato salino (PBS-D; pH 7,4) formando uma suspensão polimicrobiana. Cem microlitros desta suspensão foram então diluídos 10 vezes em água bidestilada ultrapura. O DNA alvo foi obtido pelo aquecimento da suspensão bacteriana diluída, por 10min. em banho à temperatura de 100° C, como descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Concomitantemente, 0,5 mL da suspensão bacteriana concentrada foi misturada a 0,5 mL de TSB duplo, com 20% de glicerol, em duplicata, e estocado a -20° C (CERQUEIRA *et al.*, 1999).

PCR multiplex para detecção de *stx*₁, *stx*₂, *eae* em *E. coli* STEC

Utilizou-se a metodologia descrita por CHINA *et al.* (1996), com os primers citados a seguir:

Ep1 - 5' AGG CTT CGT CAC AGT TG 3'
 Ep2 - 5' CCA TCG TCA CCA GAG GA 3'
 Stx1R - 5' AGA GCG ATG TTA CGG TTTG 3'
 Stx1F - 5' TTG CCC CCA GAG TGG ATG 3'
 Stx2R - 5' TGG GTT TTT CTT CGG TATC 3'
 Stx2F - 5' GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT 3'

Foram incluídos controles em todas as reações. Um controle negativo sem DNA foi usado, assim como controles de reação incluindo DNA extraídos de *E. coli* Stx-negativo DH5_α (K12), STEC Stx-positivo cepa E40705 - *stx*₁ e *eae* (CPHL, London) e STEC Stx-positivo cepa E30138 - *stx*₂ e *eae*. Os amplicons e respectivos pesos moleculares são: *Eae* - 570bp, *Stx*₁ - 388pb e *Stx*₂ - 807pb.

PCR Multiplex para detecção de *rfb* O157, O113, O111 em *E. coli* STEC

Todas as amostras *stx* e *eae* positivas foram submetidas a uma segunda reação de PCR, de acordo com os procedimentos descritos por PATON; PATON (1999), usando os primers descritos a seguir:

O157 F - 5' CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG 3'
 O157 R - 5' TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC 3'
 O113 F - 5' AGCGTT TCT GAC ATA TGG AGTG 3'
 O113 R - 5' GTG TTA GTA TCA AAA GAG GCT CC 3'
 O111 F - 5' TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC3'
 O111 R - 5' ATA GTT ATG AAC ATC TTG TTT AGC 3'

Foram incluídos controles em todas as reações: controle negativo sem DNA, *E. coli* Stx-negativo DH5_α (K12), STEC Stx-positivo cepa E40705 ou E30138 (O157), *E. coli* O113:H21 (O113) e EPEC cepa B171 (O111). Os amplicons e respectivos pesos moleculares são: O157 - 259bp, O113 - 593pb e O111- 406pb.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma alta prevalência (72,16%) de sequências *stx* (Fig. 1) foi detectada nas fezes de bovinos pertencentes a rebanhos leiteiros do Município de Jaboticabal, SP, por meio da PCR. Uma vez que, uma reação positiva com primers específicos para *stx*₁ e *stx*₂ é suficiente para confirmar a presença de STEC na amostra (PATON; PATON, 2005), pode-se concluir que 72,16% das amostras de fezes analisadas apresentaram STEC.

Esta prevalência de STEC quando comparada aos dados de propriedades leiteiras de diferentes países encontrados na literatura, os quais apresentam uma grande variação, desde 8,0%, nos EUA (WELLS *et al.*, 1991) até 44,3%, na Suíça (BUSATO *et al.*, 1999), mostra-se relativamente superior. Este resultado é concordante com o descrito por outros pesquisadores do Brasil que também registraram prevalências superiores, como 82% no Rio de Janeiro (CERQUEIRA *et al.*, 1999) e 49% no Rio Grande do Sul (MOREIRA *et al.*, 2003).

Ainda não está claro que proporção de STEC detectadas nas fezes de bovinos ou em carcaças é capaz de causar doença em seres humanos. Contudo, GYLES *et al.* (1998) defende a idéia de que todas as STEC podem ser patogênicas em condições adequadas. Isto significa que cepas menos virulentas podem causar o mesmo tipo de doença que cepas mais virulentas, desde que haja uma dose suficientemente alta e imunidade suficientemente baixa do indivíduo infectado. Certamente existem STEC não patogênicas, entretanto cada cepa de STEC deveria ser considerada uma potencial *E. coli* enterohemorrágica.

O coeficiente de prevalência do sorogrupo O157, de 14,77%, encontrado nas fezes dos animais (Fig. 1), é bem mais elevado que os resultados apresentados por HANCOCK *et al.* (1997) e VOLD *et al.* (1998), os quais obtiveram prevalências de 1,0%. CHAPMAN *et al.* (1993) isolaram *E. coli* O157 de 4% das amostras de fezes de bovinos antes do abate. Destes animais O157 positivos nas fezes, 30% também apresentaram o sorogrupo O157 na carcaça após o abate, além disso, 8% dos bovinos O157 negativos nas fezes apresentaram contaminação por O157 na carcaça. Isto indica que os bovinos são um reservatório de *E. coli* O157 e que a contaminação da carcaça durante o abate ou processamento pode ser o meio pelo qual a carne e seus subprodutos se contaminem. Carnes, provenientes não só do gado de corte, como também do gado leiteiro, têm sido associadas a surtos causados por *E. coli* O157:H7 (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

STEC pertencentes ao sorogrupo O111 também têm sido encontradas em fezes de bovinos (BETTELHEIM, 2003). Somente 0,2% dos animais foram positivos para o *rfb* O111 (Fig. 1). WELLS *et al.* (1991), KOBAYASHI *et al.* (2001) e ORDEN *et al.* (2002) relataram as seguintes prevalências, respectivamente, 0,32%,

0,56% e 1,21%. Embora o coeficiente de prevalência verificado tenha sido, relativamente, baixo, VICENTE *et al.* (2005) encontraram uma prevalência de 3,3%, dois anos antes, em trabalho realizado nas mesmas propriedades, durante o período chuvoso.

Ademais se deve lembrar que a *E. coli* O111 é um dos sorogrupos de STEC mais importante, causa reconhecida de colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) (BANATVALA *et al.*, 2001). A maioria dos surtos em seres humanos causados por outras STEC, excluindo-se a *E. coli* O157, são atribuídos a cepas pertencentes a esse sorogrupo (BETTELHEIM, 2003).

O coeficiente de prevalência de sequências *rfb* de *E. coli* O113 encontrado nos bovinos neste trabalho foi de 30,83% (Fig. 1). STEC O113 prevalentes no rebanho bovino apresentam grandes chances de entrar na cadeia de alimentação humana (PATON; PATON, 1999). O sorogrupo de STEC O113 foi um dos primeiros a ser associado à SHU; segundo KARMALI *et al.* (1985), duas a cada 12 cepas de STEC isoladas de pacientes com SHU são de *E. coli* O113.

E. coli O113 já foi isolada de alimentos como, carne moída, carne bovina, linguiça e leite (WHO..., 1998), incluindo hambúrguer congelado comercializado no Município do Rio de Janeiro (CERQUEIRA *et al.*, 1997). ARTHUR *et al.* (2002) encontraram 3,59% das amostras de carcaça bovina contaminadas por *E. coli* O113, mesmo antes da evisceração, corroborando o demonstrado por BARKOCY-GALLAGHER *et al.* (2001), que o couro e as fezes de animais destinados ao abate são as principais fontes de contaminação por patógenos durante o processamento da carne.

Em acordo com a maioria dos trabalhos publicados até o momento, a maior prevalência de STEC foi observada entre novilhas (86,09%), entretanto, a segunda maior prevalência foi encontrada em animais adultos (68,89%) e a menor em bezerros (58,88%), com diferença significativa ao nível de 5%, contrariando resultados anteriores que descrevem a prevalência em novilhas e bezerros maior que em vacas. Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por MOREIRA *et al.* (2003), no Brasil e por KOBAYASHI *et al.* (2001) no Japão, estes também relataram maior prevalência entre novilhas e vacas.

Observou-se um coeficiente de prevalência de sequências *rfb* O157 e O111 significativamente maior, entre bezerros e novilhas, ao nível de 5%. Os coeficientes de prevalência de sequência *rfb* O113 não apresentaram diferença significativa entre as categorias animais, ao nível de 5%. Estes resultados são concordantes aos descritos por WELLS *et al.* (1991) e RAHN *et al.* (1997). As razões para essas diferenças de prevalência entre faixas etárias, ainda são desconhecidas, mas podem refletir disparidade no desenvolvimento ruminal, dieta, resistência a infecções e outros fatores (WELLS *et al.*, 1991).

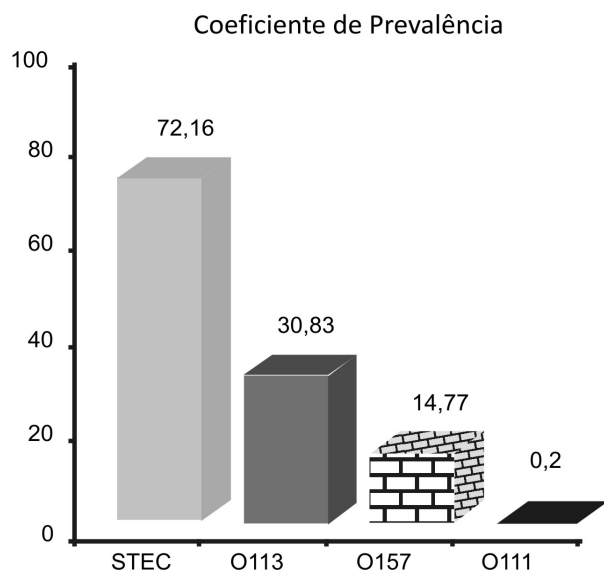


Fig. 1 - Coeficientes de prevalência de seqüências *stx* e *rfb* O113, O111 e O157 de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos, detectadas por Reação em Cadeia de Polimerase. Jaboticabal, SP, 2003.

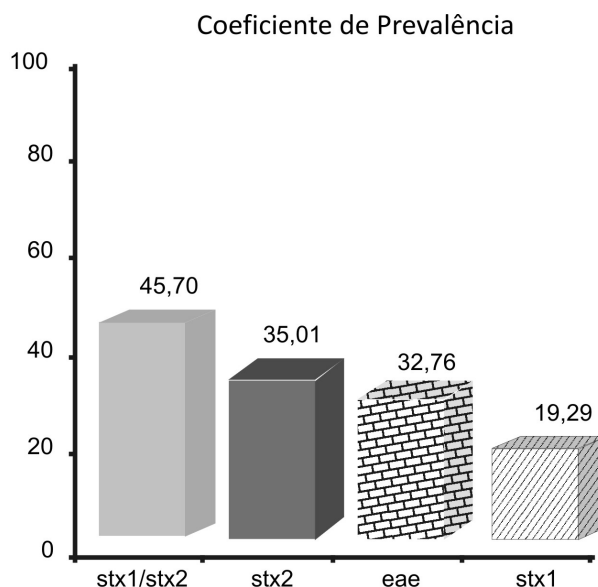


Fig. 2 - Coeficiente de prevalência de seqüências *stx*₁, *stx*₂ e *stx*₁/*stx*₂ de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos STEC positivas e coeficiente de prevalência de seqüência *eae* de *Escherichia coli* em amostras de fezes de bovinos, detectadas por Reação em Cadeia de Polimerase. Jaboticabal, SP, 2003.

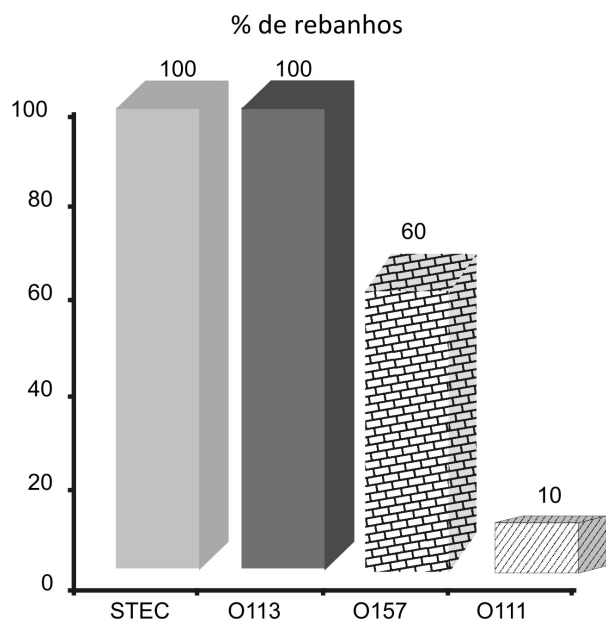


Fig. 3 - Porcentagens de rebanhos, em que *Escherichia coli* com seqüências *stx* (STEC) e *rfb* O157, O111 e O113 foram detectadas por Reação em Cadeia de Polimerase em amostras de fezes. Jaboticabal, SP, 2003.

Com exceção do sorogrupo O111, todas as outras STEC foram detectadas com maior frequência em fezes de bovinos sem diarreia. Vários autores sugerem que esses micro-organismos podem fazer parte da microbiota normal de bovinos, uma vez que são isolados com maior frequência de animais saudáveis do que de animais com diarreia (BLANCO *et al.*, 1993). Os animais infectados não são clinicamente identificáveis, o que torna o controle da disseminação entre

os bovinos difícil (GARBER *et al.*, 1995), facilitando que os portadores contaminem, por meio de suas fezes, o solo, a água, o cocho, equipamentos de ordenha e o ambiente de maneira geral.

Embora, o papel de cada Stx na patogênese das infecções causadas por cepas de EHEC e mais especificamente, no desenvolvimento da SHU, permaneça controverso (RIOS *et al.*, 1999), a maioria dos autores relata que a produção de Stx2 está associada a maior risco de desenvolver SHU (BOERLIN *et al.*, 1999). Além disso, as cepas de STEC que apresentam a seqüência *eae* são mais virulentas para seres humanos (BARRET *et al.*, 1992).

Logo, torna-se relevante o resultado obtido nesta pesquisa, na qual seqüências *stx*₁/*stx*₂, *stx*₂ e *eae* apresentaram os maiores coeficientes de prevalência entre as amostras de fezes, respectivamente, 45,70%, 35,01% e 32,76% (Fig. 2), o que foi descrito, também, por BLANCO *et al.* (1997), SANZ *et al.* (1998), VOLD *et al.* (1998) e CERQUEIRA *et al.* (1999). Segundo BLANCO *et al.* (1993) as STEC que produzem Stx₂ fazem parte do grupo bacteriano que compõe a microbiota intestinal normal do rebanho, talvez por este motivo a seqüência *stx*₂ tenha sido encontrada com bastante frequência. Ademais, as seqüências *stx*₁ e *stx*₂ estão localizadas em elementos genéticos móveis e podem apresentar diferentes padrões de mobilidade, portanto, talvez ocorra a transferência da seqüência *stx*₂ de sorotipos não patogênicos para patogênicos com maior frequência (VOLD *et al.*, 1998).

As taxas de prevalência de STEC em rebanhos apresentam flutuações significativas ao longo do

tempo (HANCOCK *et al.*, 1998). Nota-se esta variação quando da comparação entre os resultados obtidos neste estudo (Fig. 3), em que STEC foram identificadas em todos os rebanhos (100%) e os sorogrupos O157, O111 e O113 foram observados em 60%, 10% e 100% dos rebanhos, respectivamente, com os resultados obtidos por VICENTE *et al.* (2005) que analisando os mesmos rebanhos dois anos antes obtiveram, os seguintes resultados para STEC, O157, O111 e O113, respectivamente, 100%, 40%, 50% e 90%.

Testes repetidos demonstraram que STEC estão, pelo menos ocasionalmente, presentes na maioria das fazendas (HANCOCK *et al.*, 1997). Esta afirmação foi confirmada, de acordo com o descrito no parágrafo anterior, em dois testes sucessivos realizados com intervalo de dois anos, uma vez que todos os rebanhos foram positivos para STEC em ambos testes. Tais dados evidenciam que estes grupos de bactérias estão amplamente difundidos entre os animais de propriedades rurais do Município de Jaboticabal, SP.

Considerando a ampla distribuição de STEC em propriedades leiteiras, as altas taxas de prevalência já relatadas e o isolamento de vários sorotipos de alta virulência de rebanhos leiteiros e seus produtos, deveriam ser desenvolvidas estratégias a longo prazo para garantir a segurança de alimentos provenientes desses rebanhos (HUSSEIN; SAKUMA, 2005).

As fezes dos bovinos são uma fonte potencial para a disseminação de STEC à cadeia de alimentação humana e ao ambiente. Segundo KUDVA *et al.* (1995) a *E. coli* O157 pode sobreviver por pelo menos seis semanas nas fezes e possivelmente se multiplicar neste material, além disso, PORTER *et al.* (1997) relataram que o sorotipo O157:H7 foi isolado com maior frequência de amostras ambientais colhidas próximas ao depósito de esterco dos animais e, rebanhos que pastejam em piquetes tratados com esterco podem apresentar uma prevalência de STEC e O157 maior (HANCOCK *et al.*, 1994). Em um estudo de várias amostras ambientais em propriedades leiteiras, STEC foram encontradas em comedouros e baias de bezerros e vacas, demonstrando que o ambiente da propriedade pode permanecer contaminado por meses (BLANCO *et al.*, 2001).

Além dos casos em que a transmissão dá-se diretamente dos animais para os seres humanos, surtos de STEC envolvendo vegetais indicam que as fezes dos bovinos podem contaminar também este tipo de alimento. A contaminação pode ocorrer quando eles são cultivados em campos fertilizados com esterco tratado incorretamente, através da irrigação com água contaminada pelas fezes ou pela água em que são lavados (SOLOMON *et al.*, 2002).

Embora a incidência de infecção em humanos por STEC seja, relativamente, baixa, a gravidade dos sintomas e a frequência de sequelas renais e neurológicas são motivos de preocupação. A infecção é de

relevância em saúde pública e existe a necessidade de desenvolver tratamento ou medidas de prevenção. Estratégias para reduzir a prevalência em bovinos são cruciais para a diminuição da incidência de infecção em humanos (STEVENS *et al.*, 2002).

O manejo adequado de dejetos é uma das práticas que evita que as fezes bovinas se tornem fonte de contaminação ambiental por STEC. Existem outras medidas a serem tomadas a fim de reduzir a disseminação das STEC, tais como, evitar a introdução de animais infectados no rebanho, principalmente bezerros e novilhas, fazer a desinfecção adequada das baias antes de introduzir novos animais, controlar o contato entre bezerros e vacas, oferecer água potável, manter bebedouros e comedouros limpos, prover cama adequada e acomodações limpas (RAHN *et al.*, 1997; STEVENS *et al.*, 2002).

Considerando a alta prevalência de STEC em rebanhos leiteiros demonstrada no presente estudo, inclusive a detecção de sorogrupos patogênicos, pode-se concluir que os bovinos leiteiros são importantes reservatórios de STEC, levando, por meio de suas fezes, à contaminação do ambiente rural, o que constitui um risco a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ARTHUR, T.M.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; RIVERA-BETANCOURT, M.; MOHAMMAD KOOHMA-RAIE. Prevalence and characterization of non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.10, p.4847-4852, 2002.
- BANATVALA, N.A.; GRIFFIN, P.M.; GREENE, K.D.; BARRETT, T.J.; BIBB, W.F.; GREEN, J.H.; WELLS, J.G. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *Journal of Infectious Diseases*, v.183, p.1063-1070, 2001.
- BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, T.M.; SIRAGUSA, G.R.; KEEN, J.E.; ELDER, R.O.; LAEGREID, W.W.; KOOHMA-RAIE, M. Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the midwestern states of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.3810-3818, 2001.
- BARRET, T.J.; KAPER, J.B.; JERSE, A.E.; WACHSMUTH, I.K. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *Journal of Infectious Diseases*, v.165, p.979-980, 1992.
- BETTELHEIM, K.A. Non-O157 Verotoxin-producing *Escherichia coli*: A problem, paradox, and paradigm.

Non-O157 Vtec Supplement. Society for Experimental Biology and Medicine, v.228, p.333-344, 2003.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, p.1446-1451, 1993.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J. MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M.P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from health cattle. *Veterinary Microbiology*, v.54, p.309-319, 1997.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, M.I. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: DUFFY, G., GARVEY, P., McDOWELL, D. (Ed.). *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2001. p.113-148.

BOERLIN, P.; MCEWEN, S.A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R.P.; GYLES, C.L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.497-503, 1999.

BUSATO, A.; HOFER, D.; LENTZE, T.; GAILLARD, C.; BURNENS, A. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. *Veterinary Microbiology*, v.69, p.251-263, 1999.

CERQUEIRA, A.M.F.; TIBANA, A.; GUTH, B.E.C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. *Journal of Food Protection*, v.60, n.2, p.177-180, 1997.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.70, p.111-121, 1999.

CHAPMAN, P.A.; WRIGHT, D.J.; HIGGINS, R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E coli* O157. *Veterinary Record*, v.133, p.171-172, 1993.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.9, p.3462-3465, 1996.

DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S., *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Ed.). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, 1995. p.171-191.

GARBER, L.P.; WELLS, J.; HANCOCK, D.D.; DPYLE, M.P.; TUTTLE, J.; SHERE, J.A.; ZHAO, T. Risk factors

for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.207, n.1, p.46-49, 1995.

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. *Epidemiological Review*, v.13, p.60-98, 1991.

GYLES, C.; JOHNSON, R.; GAO, A.; ZIEBELL, K.; PIERARD, D.; ALEKSIC, S.; BOERLIN, P. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.4134-4141, 1998.

HANCOCK, D.D. BESSER, T.E.; KINSEL, M.L.; TARR, P.I.; RICE, D.H.; PAROS, M.G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiology and Infection*, v.113, p.199-207, 1994.

HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; RICE, D.H.; HERRIOTT, D.E.; TARR, P.I. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiology and Infection*, v.118, p.193-195, 1997.

HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; RICE, D.H.; EBEL, E.D.; HERRIOTT, D.E.; CARPENTER, L.V. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA. *Preventive Veterinary Medicine*, v.35, p.11-19, 1998.

HUSSEIN, H.S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.450-465, 2005.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; HEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, v.151, p.775-782, 1985.

KOBAYASHI, H.; SHIMADA, J.; NAKAZAWA, M.; MOROZUMI, T.; POHJANVIRTA, T.; PELKONEN, S.; YAMAMOTO, K. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.484-489, 2001.

KUDVA, I.T.; HATFIELD, P.G.; HOVDE, C.J. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.4, p.1363-1370, 1995.

MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.93, p.179-183, 2003.

- ORDEN, J.A.; CID, D.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; GARCÍA, S.; MARTINEZ, S.; DE LA FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, p.29-35, 2002.
- PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.3, p.450-479, 1998.
- PATON, A.W.; PATON, J.C. Direct detection of shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiples PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.10, p.3362-3365, 1999.
- PATON, A.W.; PATON, J.C. Multiples PCR for direct detection of shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.6, p.2944-2947, 2005.
- PORTER, J.; MOBBS, K.; HART, C.A.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, J.R.; EDWARDS, C. Detection, distribution and probable fate of *Escherichia coli* O157 from asymptomatic cattle on a dairy farm. *Journal of Applied Microbiology*, v.83, p.297-306, 1997.
- RAHN, K.; RENWICK, S.A.; JOHNSON, R.P.; WILSON, J.B.; CLARK, R.C.; ALVES, D.; McEWEN, S.; LIOR, H.; SPIKA, J. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiology and Infection*, v.119, p.251-259, 1997.
- RIOS, M.; PRADO, V.; TRUCKSIS, M.; ARELLANO, C.; BORIE, C.; ALEXANDRE, M.; FICA, A.; LEVINE, M.M. Clonal diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.3, p.778-781, 1999.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. p.9.16-9.19.
- SANZ, M.E.; VINAS, M.R.; PARMA, A.E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*, v.14, p.399-403, 1998.
- SOLOMON, E.B.; YARON, S.; MATTHEWS, K.R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.68, p.397-400, 2002.
- STEVENS, M.P.; Van DIEMEN, P.M.; DZIVA, F.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiology*, v.148, p.3767-3778, 2002.
- VICENTE, H.I.G.; AMARAL, L.A.; CERQUEIRA, A.M.F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups o157, o111 and o113 in feces, water and milk samples from dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.3, p.217-222, 2005.
- VOLD, L.; JOHANSEN, B.K.; KRUSE, H.; SKJERVE, E.; WASTESON, Y. Occurrence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiology and Infection*, v.120, p.21-28, 1998.
- WELLS, J.G.; SHIPMAN, L.D.; GREENE, K.D.; SOWERS, E.G.; GREEN, J.H.; CAMERON, D.N.; DOWNES, F.P.; MARTIN, M.L.; GRIFFIN, P.M.; OSTROFF, S.M.; POTTER, M.E.; TAUXE, R.V.; WACHSMUTH, I.K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, p.985-989, 1991.
- WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP MEETING. 1998, Berlin, Germany 23-26 June. WHO/CSR/APH/98.8. Zoonotic non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a World Health Organization Department of Communicable Disease Surveillance and Response. <http://www.who.int/emc>

Recebido em 5/5/09
Aceito em 16/11/10