

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FEZES E CARCAÇAS DE OVINOS DE PROPRIEDADES RURAIS DE DRACENA

**Everlon Cid RIGOBELLO Leonardo Susumu TAKAHASHI Daniel NICODEMO
Fernando Antonio de ÁVILA Renato Pariz MALUTA Urbano dos Santos RUIZ
Ariel Eurides STELLA**

Correspondência: UNESP – Campus de Dracena – Faculdade de Zootecnia
Rod. Cmt. João Ribeiro de Barros, Km 651 Bairro das Antas CEP 17900-000 Dracena São Paulo Brasil
Fone (18) 3821-8100 - CEP 17.900-000 – Dracena-SP.

Resumo: Foram coletados esfregaços de carcaças de ovinos abatidos em cinco propriedades rurais da região de Dracena no Estado de São Paulo e amostras de fezes desses animais, no período de janeiro à novembro de 2007. O objetivo do trabalho foi caracterizar e identificar o perfil de virulência das amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de ovinos bem como avaliar o nível de contaminação de carcaças ovinas manipuladas em frigoríficos e o risco potencial de transmissão de doenças entéricas através da ingestão de carne ovina. Cento e dezesseis cepas de *E. coli* foram selecionadas a partir de noventa e quatro carcaças de ovinos analisadas. O mês que apresentou maior contaminação pela bactéria *E. coli* foi o mês de março caracterizado por um período de chuvas. Através da técnica de PCR foi analisada a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, LT-II, STa. Todas as cepas de *E. coli* isoladas das carcaças dos ovinos abatidos foram analisadas através da técnica do PCR. Nenhuma cepa apresentou estes genes analisados. Apenas três amostras isoladas da carcaças foram positivas para o gene *stx2*. Os ovinos abatidos nas propriedades apresentaram contaminação em suas carcaças e os resultados ainda são ineficientes avaliar o quanto as carcaças contaminadas de ovinos contribuem para as infecções em humanos no Brasil.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, STEC, ovinos

CHARACTERIZATION OF THE RESISTANCE ANTIMICROBIANS OF ESCHERICHIA STRAINS ISOLATED COLI OF FECES AND CARCASSES OF OVINE OF RURAL PROPERTIES OF DRACENA

LA CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANOS DE TENSIONES DE ESCHERICHIA AISLÓ COLI DE EXCREMENTO Y CADÁVERES DE OVINE DE PROPIEDADES RURALES DE DRACENA

Abstract: We collected carcasses smears and faeces of sheep from five farms located in Dracena, State of São Paulo, during January to November of 2007. The aim of this work were characterize and identify the virulence profile from samples of *E. coli* isolated from sheep carcasses, to assess the level of contamination of sheep carcasses handled in slaughterhouses and the potential risk of transmission of enteric diseases by the ingestion of lamb meat. One hundred and sixteen *E. coli* strains were selected from the ninety four ovine analyzed carcasses. We noted that there was more contamination on March, a rainy period. Through PCR technique was analyzed the presence of the genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *LT-II* and *STa*. All the of *E. coli* strains isolated coli of the carcasses of the abated ovinos were analyzed through the technique of PCR No strain presented the analyzed genes. Three strains were positive for the gene *stx2*. The slaughtered lambs presented some contamination on its carcasses, however, another studies should be done to determine the risk of human lamb meat consumption.

Keywords: *Escherichia coli*, STEC, ovine

Introdução

Durante o processo de abate do gado, pode ocorrer a transferência das bactérias contida na pele do animal ou nas fezes para a carcaça do animal abatido. Se os procedimentos de higienização do matadouro não forem capazes de eliminar essas bactérias as carcaças serão contaminadas tornando-se um problema de saúde pública, com a grande possibilidade de causar infecção nos consumidores dessa carne (BELL, 1997; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001).

As boas práticas de higiene são importantes para a prevenção da contaminação da carcaça por microrganismos patogênicos causadores de inúmeras doenças. Os animais são reservatórios naturais específicos de alguns patógenos como *Escherichia coli* Shiga-like-toxin (STEC), *Salmonella* spp e *Campylobacter* spp., além disso e o número de intoxicações alimentares causando infecções gastrointestinais em humanos tem crescido em todo o mundo nos recentes anos (ARMSTRONG et al., 1996; RODRIGUE et al., 1990).

Nos Estados Unidos a STEC é a maior responsável por doenças diarreicas e/ou relacionadas a infecções de origem alimentar, sendo o sorogrupo mais importante o O157 que contém os genes que codificam as toxinas *Shiga-like* (NATARO e KAPER, 1998; MEAD et al., 1999).

Os ovinos abrigam muitos sorogrupos de STEC no seu trato gastrointestinal, tendo sido isolados cerca de 50 sorogrupos sendo o O101 o mais isolado na Espanha e o O119 o mais isolado no Brasil. Outros sorogrupos menos frequentes e não menos importante como O5, O9, O128, O146, tem sido isolados nos rebanhos de ovinos em países como a Alemanha os Estados Unidos (BEUTIN et al., 1997; CHAPMAN et al., 2001). Numerosos sorotipos de STEC isolados de ovinos são associados a doenças em humanos. Dos 101 sorotipos de *Escherichia coli* isoladas de ovinos, 53 sorotipos foram também isolados em humanos e 23 destes são causadores da síndrome hemolítica urêmica (SHU) (GUTIÉRREZ et al., dado não publicado citado por VETTORATO et al., 2003).

GYLES (1998) demonstraram que a presença dos fatores de virulência está relacionada aos sorotipos e parecem ser independentes da procedência de cepas isoladas. Assim, isolados de humanos e de bovinos pertencentes ao mesmo sorotipo exibem modelos similares de patogenicidade para os genes *ehx* entero-hemolisina afã (*attaching e effacing*) *slt* (*shiga-like toxin*), o que garante a possibilidade de transmissão e colonização de humanos por linhagens de origem bovina.

A *Escherichia coli* produtora da toxina shiga STEC pertence a um importante e emergente grupo de patógenos, e são associados com um largo espectro de doenças em humanos, incluindo diarreia, colites hemorrágicas e a síndrome urêmica hemolítica (SHU) em todo mundo (PATON e PATON, 1998). Ainda não se conhece uma lista completa de determinantes de virulência para STEC e *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) causadoras de doenças. Porém, a toxina Shiga é um fator chave em patogenicidade (PATON e PATON, 1998; ACHESON, 2000). Duas classes de toxina Shiga têm sido identificadas. A toxina Shiga Stx1 é 98% homóloga em estrutura biológica com a toxina Stx1 produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998), enquanto que 60% da toxina Stx2 é homóloga a toxina Stx1 ambas produzidas pela *E. coli* e elas são antigenicamente distintas (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998).

No Brasil, VETTORATO et al., 2003, analisando 48 amostras de fezes de ovinos em duas fazendas em São Paulo, verificaram a frequência de 52,1% de cepas de

STEC sendo que 50% das STEC carregavam o gene *stx1* e *stx2*, 38,1% o gene *stx1*, e 11,9% o gene *stx 2*, 33,3% carregavam o gene *ehly* presente em cepas hemolíticas.

Os ruminantes domésticos, especialmente bovinos e ovinos, tem sido considerados os principais reservatórios de STEC causadoras de infecções em humanos. A transmissão ocorre com o consumo de alimentos mal cozidos, produtos lácteos não pasteurizados, água ou vegetais contaminados por fezes, contendo cepas de STEC que fazem parte da microbiota intestinal desses animais. Recentemente, STEC O157:H7 foi detectada em fezes de ovelhas e cabras e também na carcaça desses animais abatidos, mostrando que esses pequenos ruminantes também são uma importante fonte de contaminação para humanos . Os ovinos são importantes fontes de contaminação para os humanos e tem sido menos estudados do que os bovinos e não se sabe o quanto que esses animais contribuem para as infecções em humanos no Brasil.

O objetivo do trabalho foi caracterizar e identificar o perfil de virulência das amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de ovinos bem como avaliar o nível de contaminação de carcaças ovinas manipuladas em frigoríficos e o risco potencial de transmissão de doenças entéricas através da ingestão de carne ovina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Durante o período de janeiro à novembro de 2007 foram realizadas, a cada bimestre, seis coletas de *swabs* de carcaças e de fezes de ovinos abatidos em cinco propriedades de ovinos da região da cidade de Dracena – SP.

As coletas das fezes foram feitas com o auxílio de “swabs” retais que foi introduzido diretamente no reto dos animais durante a fase que os animais ficam em descanso antes do abate. A coleta das amostras de isolados de carcaças foram feitas passando o “swab” sobre uma área de 400 cm² na região posterior da carcaça perto do ânus do animal. Para realização desse procedimento foi utilizado um quadrado de aço inox medindo 20 x 20 cm, previamente esterilizado. Após a utilização dos “swab” eles foram imediatamente transferidos em meio de cultura caldo verde brilhante em sacos de plásticos esterilizados sendo que esses sacos foram transportados para o laboratório de microbiologia da Faculdade de Zootecnia do Campus Experimental de Dracena e

incubados em estufa microbiológica a 37° C por 12 horas conforme (RIGOBELLO et al., 2006).

Isolamento da bactéria *Escherichia coli*

Após o tempo de incubação de 12 horas, uma alíquota de 1 mL do caldo verde brilhante foi transferida e inoculada em placas de Petri contendo ágar MacConkey e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação das placas de Petri contendo agar MacConkey as colônias contidas nas placas que apresentavam semelhança à bactéria *Escherichia coli* foram submetidas aos testes bioquímicos de TSI, citrato, Vogers Proskauer, uréia e idol para identificação de confirmação da espécie bacteriana (KONEMAN et al., 1997).

Manutenção das cepas no laboratório

Após o isolamento, cada uma das cepas obtidas foi conservada de duas maneiras:

1-) Por meio de repique semanal em Placas de Petri ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio Lúria Bertani e conservado a 4° C em geladeira.

2-) Em freezer a -20° C em 2 tubos de plásticos de microcentrifuga contendo 50% de cultura em caldo Lúria Bertani e mais 50% de uma solução de glicerol a 70%.

Extração do DNA bacteriano

O DNA microbiano foi extraído segundo a técnica proposta por Keskimaki et al. (2001), onde a colônia de *E. coli* isolada foi semeada e incubada a 37°C, por 12 horas, em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio Lúria Bertani. Em seguida a cultura foi transferida para um tubo *ependorf* e centrifugada a 15.000 rpm para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. Esse material foi estocado em freezer a -20°C até o momento de uso.

Amplificação por PCR

Um total de 116 cepas de *E. coli* foi submetido ao PCR; *stx1*, *stx2* e *eae* foram os genes testados usando os *primers* e as condições de PCR descritas por China et al. (1996). A presença do gene LT-II foi verificada através de PCR usando um par de *primers* e condições descritas por PENTEADO et al., (2002).

Sensibilidade aos antimicrobianos

Para a realização desses testes as cepas de *E.coli* foram repicadas em tubos contendo 5mL de caldo triplicase soja e incubadas a 37°C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica em tubos contendo 4mL de solução salina esterilizada. A seguir, as culturas diluídas na concentração 1/2 da escala de MacFaland foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados os polidiscos contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37°C através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada (BAUER et al., 1966). Os antimicrobianos testados foram: amoxicilina/ácido clavulânico (Amc); amicacina (Ami); ampicilina (Amp); ceftriaxone (Cep); cefalotina (Cef); ciprofloxacina (Cip); gentamicina (Gen); ácido nalidixico (Nal); streptomomicina (Ste); tetraciclina (Tet); trimetroprina (Tri).

RESULTADOS

Das 94 carcaças 39,3% (37) apresentavam contaminação por *E. coli* e foram isolados 116 cepas de *E. coli* (Tabela 1). Dos 94 *swabs* retais coletados, quando os animais ainda estavam vivos, foram isolados 227 cepas de *Escherichia coli* (Tabela 2.)

O número de isolados foi 57% maior no período de coleta da estação das chuvas, nos meses de janeiro e março do que no período da estação da seca, nos meses de maio e julho, sendo respectivamente o total de 59 e 34 isolados (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Escherichia coli* coletadas em cinco propriedades rurais da cidade de Dracena – SP.

Table 1. Escherichia coli isolated collected in five rural properties of the Dracena city.

Coletas	Carcças/carcças contaminadas	Isolados
Janeiro/2007	20/8	25
Março/2007	16/6	34
Maio/2007	2/1	9
Julho/2007	25/12	25
Setembro/2007	13/4	13
Novembro/2007	18/6	10
Total	94/37	116

Formatado: Centralizado

Tabela 2. Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* coletados nas propriedades rurais da cidade de Dracena – SP

Table 2. Distribution of the Escherichia coli isolated collected in the rural properties of the Dracena city.

Propriedades rurais	Isolados de fezes	Isolados de carcaças
1	42	36
2	43	28
3	48	17
4	60	25
5	34	10
Total	227	116

A propriedade 5 apresentou a menor contaminação das carcaças no período sendo o número de isolados igual a 10. A propriedade 1 foi a que apresentou a maior contaminação, sendo o número de isolados foi igual a 36. Esses valores mostram que a propriedade 1 apresentou uma contaminação 27% maior que a propriedade que apresentou a menor contaminação. Dos meses de coleta das amostras o que apresentou maior contaminação das carcaças dos animais foi o mês de março e o mês que apresentou menor contaminação das carcaças foi o mês de maio (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição do número de isolados de *Escherichia coli* em relação às coletas nas propriedades rurais da região de Dracena - SP.

Table 3. Distribution of the isolated number of *Escherichia coli* in relation to the collections in the rural properties of the Dracena city.

Coletas	Propriedades rurais					Total
	1	2	3	4	5	
	Número de isolados de carcaças					
Janeiro/2007	05	05	08	05	2	25
Março/2007	10	08	02	12	2	34
Maió/2007	01	02	02	01	3	9
Julho/2007	12	06	02	04	1	25
Setembro/2007	06	04	01	01	1	13
Novembro/2007	02	03	02	02	1	10
Total	36	28	17	25	10	116

De cada cultura de *E.coli* uma colônia foi testada para avaliação de sua sensibilidade a 11 agentes antimicrobianos. A resistência mais comumente observada foi para cefalotina (72%), ceptriaxone (22%), ciprofloxacina (22%) e de forma menos freqüente para amicacina (4%), estreptomicina (7,0%) e gentamicina (9,0%).

DISCUSSÃO

Os pêlos e fezes dos animais presentes nas carcaças têm-se mostrado as maiores fontes de patógenos durante o processamento das mesmas (ELDER et al., 2000; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001). Ainda não está claro qual é a quantidade de STEC não seja O157 encontrada em fezes ou carcaças de bovinos e de ovinos que pode causar o aparecimento de doenças em humanos. GYLES, (1998) defende a idéia que toda bactéria STEC poderá ser patogênica dependendo das circunstâncias, principalmente do estado do hospedeiro.

No presente trabalho o nível de cepas de STEC encontrado foi de 2,58%, o mesmo nível relatado por outros autores (ROGERIE et al., 2001; LEUNG et al., 2001). Segundo o nosso conhecimento não existem dados obtidos no Brasil que nos permitam realizar uma comparação com os dados aqui apresentados. Alguns autores brasileiros relataram a detecção de cepas de STEC em amostras fecais de bezerros (MOREIRA et al., 2003; IRINO et al., 2005) em amostras de diarreia de bezerros (LEOMIL et al., 2003), em amostras provenientes de mastite (LIRA et al., 2004), e ausente em

abatedouros. Em todos os relatos o gene *stx2* tem sido encontrado de forma predominante, e as cepas STEC que não são O157 também foram encontradas em maior número no Brasil, 0,6% sendo que apenas um pequeno número de cepas O157 foi detectado em fezes de bovinos, conforme descrito por IRINO et al. (2005). No entanto, as cepas O157:H7 isoladas no Estado de São Paulo provenientes de infecções em humanos apresentavam a capacidade de produzir a toxina Stx (IRINO et al., 2005; VAZ et al., 2004.), mas predominantemente expressavam o gene *stx1*.

O conjunto dos fatores de virulência suficientes para que cepas de STEC possam causar doenças não estão bem definidos, entretanto, associação entre a presença de certos genes e a habilidade para estabelecer doenças em humanos tem sido estabelecida para certas toxinas. Um estudo do perfil de isolados clínicos de cepas O157:H7 feito por OSTROFF et al. (1989) mostrara que pacientes infectados por cepas carregando apenas o gene *stx 2* apresentavam 6,8 vezes mais a possibilidade de promover o aparecimento de uma gastroenterite mais severa, do que os indivíduos infectados por cepas que portavam apenas o gene *stx1* ou ambos *stx 1* e *stx 2*. Assim, cepas que carregam *stx 2* podem representar um grave perigo para a saúde humana. Alguns estudos epidemiológicos têm associado à presença do gene *eae* em STEC com diarreias severas (BONNET et al., 1998; ACHESON, 2000). Entretanto em alguns casos de SHU, foram relatadas cepas de STEC que não carregavam o gene *eae* (BONNET et al., 1998; PATON et al., 1999), isto ainda permanece um aspecto controverso na etiologia das doenças provocadas por STEC.

Por mais de quatro décadas tem sido comum nas fazendas o uso de agentes antimicrobianos para prevenção de doenças e também como promotores de crescimento animal. O intenso uso de agentes antimicrobianos pode levar a seleção de bactérias resistentes nos bovinos e promover um aumento na frequência de cepas STEC multiresistentes a drogas em bovinos. Isto pode favorecer um aumento da população de cepas STEC, o que indiretamente pode aumentar a contaminação dos alimentos por estas cepas (ZHAO et al., 2001).

O trabalho objetivou apresentar a contaminação da carcaça do animal por *E. coli* provavelmente pelas condições higiênicas de abate, podendo ocasionar um problema de saúde. Os ovinos, além dos bovinos, podem ser fontes de contaminação e estes são menos estudados que os bovinos, resultando em dados ineficientes que possam esclarecer o quanto a carcaça contaminada de ovinos contribuem para as infecções em humanos no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, D. W. How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically? **Journal of Food Proteomic**, v.63, p.819-821, 2000

ARMSTRONG, G.L; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, JR. J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, 18, 29-51, 1996.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, G.A; SIRAGUSA, G.R; KEEN, J.E; ELDER, R.O; LAEGREID, W.W e KOOHARAIE,M. Genotype analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 non motile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, n.67, p.3810-3818, 2001.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M. M.; SHERRIS, J.G.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology** v. 45, p. 493-496, 1966.

BELL, R.G. Distribution and sources of microbial contamination of beef carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p.292-300, 1997.

BEUTIN, L., GEIER, D., STEINRUCK, H., ZIMMERMANN, S., SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2483-2488, 1997.

BLANCO, M; BLANCO, J.E; BLANCO, J; MORA, A; PRADO, C; ALONSO, M.P; MOURINO, M; MADRID, C; BALSALOBRE, C; JUAREZ, A., Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p.309-319. 2001.

BONNET, R; SOUWEINE, B; GAUTHIER, G; RICH, C; LIVRELLI, V; SIROT, J; JOLY,B; FORESTIER, C. Non-O157:H7 stx2 producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic uremic syndrome in adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v..36, p.1777-1780, 1998.

CHAPMAN, P.A., CERDAN, M.; ELLIN, M. ASHTON, R.; HARKIN, M.A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. **International Journal Food Microbiology** 64, p.139-150, 2001.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.82, p. 3462-3463, 1996.

ELDER, R.O; KEEN, J.E; SIRAGUSA, G.R; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; KOOHMARAIE,M; LAEGREID, W.W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.97, p. 2999-3003, 2000.

GYLES, C. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. of human and bovine origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4134-4141, 1998.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. 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.

KESKIMAKI, M.; MATTILA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology. Infecty. Diseases**. n.40, p. 151-156, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; SCHREKENBERGER, P.C.; JANDA, W.M.; WINN, W.C., **Color atlas and textbook microbiology, 5 ed.** Philadelphia, Lippincott Company, 1997.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUT H, B.E.C.; IRINO, K.; VETTORATO, M.P.; ONUMA, D.L.; DE CASTRO, A.F.P., Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 103-109, 2003.

LEUNG, P.H.M; YAM, W.C; NG, W.W; PEIRIS, J.S. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. **Epidemiology and Infections**, v. 126, p.173-179, 2001.

LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M., The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 861-866, 2004.

MEAD, P.S; SLUTSKER, L; DIETZ, V; MCCAIG, L.F; BRESSE, J.S; SHAPIRO, C; GRIFFIN, P.M; TAUXE, R.V. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p. 607-625, 1999.

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.

NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p. 142-201, 1998.

OSTROFF, S.M; TARR, P.L; NEIL, M.A; LEWIS, J.H; HARGRETT-BEAN, N.; KOBAYASHI, J.M. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic

sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 160, p. 994-998, 1989.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p.450-479, 1998.

PATON, A.W; WOODROW, M.C.; DOYLE, J.A.; LANSER, A.; PATON, J.C., Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3357-3361 1999.

PENTEADO, A.S; UGRINOVICH, L.A; BLANCO, J; BLANCO, M; BLANCO, J.E; MORA, A; ANDRADE, J.R.C; CORRÊA, S.S; PESTANA DE CASTRO, A.F Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.89, p.41-51, 2002.

RODRIGUE, D.C., TAUXE, R.V. ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and Infection** 105, 21-27, 1990.

ROGERIE, F.; MARECAT, A.; GAMBADE, S.; DUPOND, F.; BEAUBOIS, P.; LANGE, M. Characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* and O157 serotype *Escherichia coli* isolated in France from healthy domestic cattle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 217-223, 2001.

RIGOBELLO, E.C.; STELLA, A.E.; ÁVILA, F.A.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Characterization of *E. coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brasil. **International Journal of Food Microbiology**, 110, p.194-198, 2006.

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.; DIAS, M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C.; ROCHA, M.M.M.; GUTH, B.E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 903-905, 2004

VETTORATO, M.P; LEOMIL, L.; GUTH, B.E.C.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brasil. **Veterinary Microbiology**, 95, p.103-109, 2003.

ZHAO, S.; WHITE, D.G.; GE, B.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; WAGNER, D.; GAINES, S.; MENG, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1558-1564, 2001.