

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM
ANIMAL

PAULO GOMES DE LIMA

COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* PRODUTORAS
DE TOXINA SHIGA (STEC) NÃO O157 EM QUEIJO MINAS
FRESCAL E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM AÇO
INOXIDÁVEL

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2014

PAULO GOMES DE LIMA

COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) NÃO O157 EM QUEIJO MINAS FRESCAL E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM AÇO INOXIDÁVEL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Area de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, para a obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON MAIA FRANCO

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a ALICE GONÇALVES MARTINS GONZALEZ

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a LUCIANA MARIA RAMIRES ESPER

NITERÓI

2014

COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) NÃO O157 EM QUEIJO MINAS FRESCAL E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM AÇO INOXIDÁVEL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Area de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 10 de Outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Orientador – UFF

Prof^a Dr^a. Luciana Maria Ramires Esper – UFF

Prof. Dr. Marco Antônio Sloboda Cortez - UFF

Prof^a Dr^a. Karen Signori Pereira – UFRJ

Prof^a Dr^a. Mirian Ribeiro Leite Moura - UFRJ

Niterói

2014

Dedico este trabalho aos meus filhos: Leonardo, Eduardo e Ricardo Couto de Lima, à minha mãe Cecília e ao meu pai Arlindo Francisco de Lima “*in memorium*” e aos meus irmãos Alberto e Arlindo Gomes de Lima.

Na academia, dedico aos professores doutores: Edson Lessi “*in memorium*”, Sandra Casanova Derivi e Maria Heidi Marques Mendez pela importância que tiveram na minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e pela luz que me conduz;

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Robson Maia Franco, Prof. Dra. Alice Gonçalves Martins Gonzalez e à Prof. Dra. Luciana Maria Ramires Esper;

Aos componentes da banca de avaliação em especial aos prof. Drs Marco Antônio Sloboda Cortez, Prof. Dra. Karen Signori Pereira, por terem participado da banca de qualificação e à Prof. Dra. Mirian Ribeiro Leite Moura;

Aos funcionários da Pós-Graduação em Higiene Veterinária: Drausio de Paiva Ferreira, Mariana de Oliveira e André Luiz da Silva Veiga;

Aos funcionários do Laboratório de Higiene e Controle Microbiológico e de Bromatologia: Lucia Helena Santos de Almeida e Aline de Luna;

Aos bolsistas do Laboratório de Higiene e Controle Microbiológico: Thalita Martins da Silva, Julia do Prado Lima Guimarães Cabral, Marcel Amorim;

Aos amigos: Prof. Néilton Ventura, Dra. Mônica de Oliveira Lins, Dra. Fátima Regina de Oliveira Araujo;

Aos amigos e aos colegas da Faculdade de Farmácia e da Faculdade de Veterinária;

E a Júlia Couto de Lima.

“Está alta no céu a lua e é primavera.

Penso em ti e dentro de mim estou completo”.

Fernando Pessoa

RESUMO

A existência de um reservatório animal é de capital 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. Contudo, surtos envolvendo STEC não pertencentes ao sorogrupo O157 (STEC não-O157) têm sido descritos. Embora pesquisadores constatem a elevada ocorrência destes microrganismos em bovinos no Brasil, pouco se sabe sobre a transmissão destes microrganismos por produtos de origem animal, como carne, leite e derivados. Entre os derivados do leite, o queijo é um dos principais produtos, sendo, o Queijo Minas Frescal (QMF) um dos queijos mais consumidos no Brasil. Diante do exposto, visou-se no presente trabalho avaliar a viabilidade de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) em queijo minas frescal. Com base nos resultados ficou demonstrado que o processamento do QMF não elimina os microrganismos e a temperatura máxima de refrigeração recomendada pela legislação (8° C) não inibe ou elimina o crescimento bacteriano. Outro fator de risco é a capacidade de sorotipos de STEC de aderir, colonizar e formar biofilme em grande variedades de superfície de contato, de material usados nas plantas de processamento de alimentos. Nas cepas estudadas foi observada a capacidade de formação de biofilmes (5,06 a 6,02 log UFC/cm² de células sésseis) e quando estas foram submetidas ao sanitizante hipoclorito de sódio a 100 e 200 mg.L⁻¹ foram reduzidos a >1 log UFC/cm². Reforça-se, portanto, a atenção à qualidade da matéria-prima, das ferramentas de qualidade na criação animal e na indústria de alimentos para garantir a inocuidade do produto final.

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

ABSTRACT

The existence of an animal reservoir has a great importance in the transmission of *Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC) to humans. Epidemiologically, serotype O157: H7 has been the most involved in outbreaks of human disease caused by STEC. However, outbreaks involving STEC that don't belong to serogroup O157 (STEC non-O157) have been described. Although researchers found high occurrence of these microorganisms in cattle in Brazil, little is known about the transmission of these microorganisms by animal products in our country, such as meat, milk and dairy products. Among dairy products, cheese is one of the main products and the Minas Frescal Cheese (MFC), the most consumed cheeses in Brazil. So, the present work aims to evaluate the viability of *Escherichia coli* O153: H25, O113: H21 and O111: H8 (STEC non-O157) in Minas Frescal Cheese. Based on the results, was demonstrated that the MFC processing does not eliminate the microorganisms and the maximum refrigeration temperature recommended by the legislation (8° C) does not inhibit or eliminate bacterial growth. Another risk factor is the ability of STEC's serotypes to adhere, colonize and form biofilm in a large varieties of surfaces used in food processing plants. In the studied strains was observed the ability of biofilm formation (5.06 to 6.02 log CFU/cm² of sessile cells) and when subjected to the sanitizer sodium hypochlorite 100 and 200 mg.L⁻¹, the biofilms were reduced to > 1 log UFC/cm². Emphasize 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 the final product.

Key words: STEC non-O157, Minas Frescal Cheese, shiga toxin-producing, Biofilms, sanitizer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, f. 12

2 REVISÃO DA LITERATURA, f. 14

2.1 ASPECTOS GERAIS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA, f.14

2.2 PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC/EHEC), f.15

2.3 VIRULÊNCIA DE STEC, f. 19

2.4 STEC DO SOROTIPO O153:H25; O113:H21 e O111:H8, f. 21

2.5 CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS, f.22

2.6 RESERVATÓRIO ANIMAL E TRANSMISSÃO, f. 23

2.7 TRANSMISSÃO DE STEC, f. 23

2.8 CONTAMINAÇÃO DE STEC EM LEITE E DERIVADOS, f. 26

2.9 FATORES QUE AFETAM O DESENVOLVIMENTO DE *E. coli*
EM ALIMENTOS, f. 29

2.10 FORMAÇÃO DE BIOFILME, f. 30

3 DESENVOLVIMENTO, f. 34

3.1 ARTIGO 1: VIABILIDADE DE *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 E O111:H8 (STEC NÃO-O157) PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA EM QUEIJO MINAS FRESCAL (QMF), f. 34

3.2 ARTIGO 2: FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 E O111:H8 (STEC NÃO-O157) PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL UTILIZADA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E A EFICÁCIA DE SANITIZANTE., f. 48

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, f. 64

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 65

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Fig. 1 Contagem de STEC não-O157 em queijo minas frescal, preparado após inoculação de 10^3 UFC.ml⁻¹ dos microrganismos em leite., f. 39

Fig. 2 Contagem de STEC não-O157 em queijo minas frescal, preparado após inoculação de 10^5 UFC.ml⁻¹ dos microrganismos em leite., f. 40

ARTIGO 2

Fig. 1 Evolução da população (log UFC.cm⁻²) de células Sésseis de isolados de *E. coli* STEC não-O157 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4., f. 53

Fig. 2 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O153:H25 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4., f. 57

Fig. 3 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O113:H21 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4., f. 58

Fig. 4 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O111:H8 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4., f. 59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Composição dos principais produtos lácteos., f.28

ARTIGO 2

TABELA 1 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O153:H25 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4., f. 57

TABELA 2 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O113:H21 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4., f. 58

TABELA 3 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O111:H8 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4., f. 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	Do inglês “Attaching-Effacing”
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CH	Colite Hemorrágica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeo
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMSF	Do inglês “International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
LEE	Do inglês “Locus of Enterocyte Effacement”
PBS	Do inglês “Phosphate Buffer Salt”
PCR	Do inglês “Polymerase Chain Reaction”
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
QMF	Queijo Minas Frescal
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SLT	Do inglês “Shiga-like toxin”
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
TSA	Do inglês “Trypticase Soy Agar”
TSB	Do inglês “Trypticase Soy Broth”
UV	Ultra Violeta
VT	Verotoxina

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil vêm crescendo a cada ano. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2011 o volume de leite produzido foi de 32.296 milhões de litros (EMBRAPA, 2012). Entre os derivados lácteos, o queijo é um dos principais produtos e o que tem a mais alta demanda de consumo, cuja produção sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) foi estimada em 745 mil toneladas (ABIQ, 2011).

Nos últimos anos com o aumento da produção leiteira no Brasil, muitas fazendas estão sendo tecnificadas, não só pela exigência do consumidor, como pelos órgãos fiscalizadores e a consciência do produtor para obter maior ganho em sua produção. Contudo o comércio informal ainda persiste, não havendo neste comércio produção higiênico-sanitária adequada o que pode ocasionar maior veiculação de agentes etiológicos de doenças alimentares às diferentes categorias de ingestores.

Para a obtenção de leite com microbiota inócua ao consumidor e aumento do prazo de validade comercial e produtos lácteos de qualidade utiliza-se a pasteurização da matriz alimentícia. Na Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento MAPA, constam todos os requisitos necessários para a obtenção de leite de qualidade a ser consumido em todo território nacional. Mesmo com os cuidados preconizados pode ocorrer contaminação bacteriana pós pasteurização, que tem sido grande obstáculo para a manutenção da validade comercial do leite fluido. Duas fontes principais contribuem para a contaminação pós pasteurização: resíduos de leite nos equipamentos e aerossóis. Procedimentos de limpeza ineficazes nos equipamentos de processamento de leite surgem resíduos que permitem que as bactérias se multipliquem, formem biofilme com possibilidade de contaminar o fluxo de leite posterior.

É de amplo conhecimento na literatura nacional que 60 – 70% dos bovinos brasileiros são reservatório de STEC no trato intestinal, sendo esta microbiota eliminada pelas fezes. No entanto a transmissão pelas matrizes alimentícias animais (carne, leite e derivados) ainda não são conclusivas.

Epidemiologicamente, o sorotipo O157:H7 tem sido o mais envolvido em surtos de doença humana causada por STEC (KARMALI, 1989; PATON; PATON, 1998a; TARR, 1995). No entanto, STEC não-O157, foram isoladas de pacientes com

diarreia não sanguinolenta (BROOKS et al., 2005; PIERARD et al., 1990) e em vários países são relatados casos de infecção em humanos com colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) envolvendo mais de 50 sorotipos de cepas de STEC não-O157. (CAPRIOLI et al., 1997, 2005; JOHSON et al., 1996; LEOTTA et al., 2008).

Outro problema na produção industrial é o estado higiênico da superfície dos equipamentos e processadores de alimentos, por serem fontes potenciais de microrganismos deterioradores e patogênicos, sendo possível ocorrer adesão bacteriana e formação de biofilmes em praticamente todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos. Um fato preocupante é que o desenvolvimento de células em biofilme promove a expressão de propriedades distintas das células suspensas, uma das quais é o aumento da resistência aos sanitizantes, tornando-se um problema de saúde pública, devido a contaminação cruzada (HOOD; ZOTTOLA, 1995; KIM; RYU; BEUCHAT, 2007; RYU; BEUCHAT, 2005).

Como o laboratório de Higiene e Controle Microbiológico de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense dispõe de diversificada coleção de cepas de STEC isoladas no país, representando diferentes sorotipos, origens e perfis de virulência e considerando a escassez de maiores informações sobre estas cepas, esse trabalho objetivou estudar o comportamento das cepas de *E.coli* (STEC não-O157) como O153: H25; O113: H21 e O111: H8 produtoras de toxina Shiga relacionadas com doença humana em Queijo Minas Frescal (QMF), importante produto lácteo brasileiro. Outro ponto de importância na segurança alimentar, foi pesquisar a capacidade de formação de biofilmes destas cepas e avaliar a ação do sanitizante, hipoclorito de sódio nas concentrações de 100 e 200 mg.L⁻¹, na superfície de aço inoxidável AISI 304, amplamente utilizado nos programas de higienização das indústrias de laticínios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DE *Escherichia coli*

Desde 1885, quando foi isolada pela primeira vez, a partir de fezes de criança e descrita pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich, recebeu toda a atenção da comunidade científica, de modo que, atualmente *E. coli* é considerado o microrganismo de vida livre mais conhecido (ADAM; MOSS, 2008).

E. coli pertence à família Enterobacteriaceae é um anaeróbio facultativo, predominante na microbiota de animais de sangue quente, Gram-negativa, no formato de bacilo com 1 a 2 µm de comprimento, não esporulado, catalase-positiva, oxidase-negativa, fermentam glicose com produção de ácido e gás e a maioria das estirpes fermentam também a lactose, sendo, algumas cepas ácido resistentes (BHUNIA, 2008).

Esse microrganismo coloniza o trato gastrointestinal das crianças logo após as primeiras horas de vida. Depois, a *E. coli* e hospedeiro passam a ter uma relação de benefício mútuo. *E. coli*, geralmente, permanece inofensivamente no lúmen intestinal, todavia, em um hospedeiro limitado ou imunodeprimido, cepas de *E. coli* mesmo não patogênicas, podem causar infecção. Contudo, mesmo o mais saudável membro da espécie humana pode ser susceptível a uma das várias cepas de *E. coli* altamente adaptadas e que causam um amplo espectro de doenças (ADAMS; MOSS, 2008; BHUNIA, 2008; NATARO; KAPER, 1998).

Cepas patogênicas de *E. coli* conhecidas como causadoras de gastroenterite são classificadas com base na sua propriedade de virulência em: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), STEC/EHEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga/*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* de aderência difusa) (ADAMS; MOSS, 2008; FARROKH et al., 2013).

E. coli é rotineiramente exposta ao ambiente pelas fezes e podem contaminar a água e o solo e, conseqüentemente, frutas e vegetais, especialmente se adubos não tratados forem usados como fertilizantes. As carnes também são uma fonte comum de *E. coli*, uma vez que podem ser contaminadas durante o abate por contato fecal. Esse microrganismo também tem sido associado com produtos lácteos e maionese (BHUNIA, 2008).

A sorotipagem de *E. coli* ocupa um lugar central na história deste patógeno. Kauffman (1944), propôs um esquema para classificação sorológica que ainda continua sendo utilizado com algumas modificações. A classificação baseia-se na caracterização dos antígenos somáticos (O), flagelares (H), e capsulares (K). A combinação entre os antígenos O e H define o sorotipo de uma estirpe (NATARO; KAPER, 1998).

2.2 *E. coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC/EHEC)

O primeiro reconhecimento de STEC como uma classe de *E. coli* patogênica foi em 1983, relatado por Riley et al. que investigaram dois surtos de doença gastrointestinal caracterizada por cólica abdominal, diarreia aquosa seguida de diarreia sanguinolenta e febre baixa (moderada), essa doença foi nomeada de colite hemorrágica e estava associada com a ingestão de hambúrguer mal cozido de uma cadeia de fast-food. Nas culturas de fezes desses pacientes foi diagnosticado um sorotipo raramente isolado, O157:H7. Paralelamente, Karmali et al. (1983), associaram casos esporádicos SHU com presença de uma citotoxina produzida por *E. coli*. A SHU foi definida pela tríade falência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática, sendo observado que a SHU é tipicamente precedida de diarreia sanguinolenta indistinguível de Colite Hemorrágica (CH). O ensaio com a citotoxina realizado por Karmali et al. (1983), foi originalmente realizado por Konowalchuk et al. (1977), os quais observaram que o sobrenadante da cultura de cepas de *E. coli* produziam um efeito citopático irreversível em culturas de células Vero (linhagem celular derivada de rim de macaco verde africano), denominando esta toxina de Verotoxina (VT). O`Brein e Laveck (1983) relataram que algumas cepas de *E. coli* possuíam efeito citotóxico para células HeLa (adenocarcinoma uterino humano) e que os efeitos tóxicos eram neutralizados por anti-toxina preparada contra *Shigella dysenteriae* 1 (toxina Shiga). Por conseguinte, denominaram então esta toxina de "Shiga-like toxin" (SLT). O`Brien e Laveck (1983), demonstraram que SLT e VT eram a mesma toxina e que as cepas de *E. coli* O157:H7 descritas por Riley et al. (1983), produziam esta toxina. Durante muito tempo EHEC foi sinônimo do sorotipo O157:H7, mas depois outros sorotipos (O26:H11, O103:H2, O111:H-, O145:H-, O157:H-) também foram associados com

CH. Então, a definição de EHEC foi ampliada para incluir outros sorotipos e o termo EHEC passou a ser utilizado para designar cepas de STEC que causam CH, SHU, produzem toxina Shiga (*Stx*), e causam lesão “attaching-effacing” (A/E) nas células epiteliais ou possuem material genético para produção desta lesão. STEC ou VTEC é o termo utilizado para cepas de *E. coli* que produzem somente *Stx* (MAINIL; DAUBE, 2005).

Então, observa-se que na nomenclatura EHEC é encontrada um subgrupo de STEC que além de produzir toxina Shiga possui os fatores de virulência. No entanto não é claro que, no caso das STEC, apenas a produção de toxina Shiga sem os outros fatores de virulência confira patogenicidade, enquanto que todas as cepas de EHEC são patogênicas (NATARO; KAPER, 1998). Portanto, O157:H7 é uma STEC que produz *Stx*, lesão A/E ou possuem material genético para a produção da toxina.

A dupla nomenclatura (VT/SLT) adotada para referir-se à toxina e suas variantes fez com que CALDERWOOD et al., 1996, propusessem uma nova nomenclatura, reconhecendo estas toxinas como pertencentes a família das toxinas Shiga (*Stx*). Nesta nomenclatura, as *E. coli* que carregam o gene *stx* ou elaboram a toxina *Stx*, são referidas como “Shiga toxin-producing *E. coli*” (STEC). Infecções envolvendo STEC não-O157 vem sendo relatadas em vários países e mais de 50 sorotipos destas STEC foram isolados de humanos com colite hemorrágica ou SHU (CAPRIOLI et al., 1997; JOHNSON et al., 1996). Certos sorogrupos como O26, O103 e O111 foram isolados de humanos, embora outros sorogrupos como O91, O104 e O113, possam associar-se a surtos ou casos esporádicos de doença humana (JOHNSON et al., 1996; PATON; PATON, 1998a).

Surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157:H7, O157:H-, O26:H11, O111:H8, O111:H-, O103:H2, O113:H21 e O145:H- (CAPRIOLI et al., 1997; ETHELBERG et al., 2009; JOHNSON et al., 1996; PATON; PATON, 1998b).

Alguns autores sugeriram que STEC não-O157 sejam responsáveis por 25% dos casos de SHU nos EUA (JOHNSON et al., 1996). Em muitos países, como Chile (OJEDA et al., 1995), Argentina (LOPEZ et al., 1989) e Austrália (GOLDWATER; BETTELHEIM, 1994), STEC não-O157 foram responsáveis pela maioria dos casos de SHU. Cepas STEC não-O157 foram isoladas de pacientes com diarreia não sanguinolenta (PIERARD et al., 1990).

Bovinos constituem o principal reservatório animal e os humanos são infectados especialmente pela ingestão de carne bovina mal cozida e leite não pasteurizado (FRANCO, 2012; LAW, 2000; PATON; PATON, 1998b). Este microrganismo está envolvido em diversos surtos e casos esporádicos de CH e SHU principalmente no hemisfério Norte (PATON; PATON, 1998b), embora na Argentina tenha ocorrido a maior prevalência mundial de SHU (LÓPEZ et al., 1998).

Na Argentina, a maior incidência de casos de SHU no mundo, foram em crianças com cinco anos de idade ou menos e esta síndrome foi responsável pelo desenvolvimento de falha renal aguda e segunda maior causa de falha renal crônica e transplante de rins em crianças, sendo a taxa de mortalidade de crianças com essa síndrome em torno de 5%. Alguns autores constataram a presença de EHEC O157:H7 em crianças com SHU, indicando uma relação entre este patógeno e esta enfermidade (RIVAS et al., 2008; RIVERO et al., 2010).

MONAGHAN et al, 2012, estudaram 450 carcaças de carne de bovino de três abatedouros na Irlanda usando Polymerase Chain Reaction (PCR) e métodos tradicionais de cultura, por 12 meses e encontraram 67% (122/450) das carnes e 27% (122/450) das carcaças positivas para STEC. Tendo 40 representantes de 12 sorotipos (O5:H-, O13:H2, O26:H11, O33:H11, O55:H11, O113:H4, O128:H8, O136:H12, O138:H48, O150:H2, O168:H8, e ONT:H11) e 15 sorotipos – virotipo combinados foram identificados. Os autores ainda relataram que há necessidade de vigilância dos não-O157, como também foi evidenciado que os bovinos, são fontes clinicamente significativas de STEC.

As infecções humanas por STEC frequentemente ocorrem como surto epidêmico, determinando a intensa mobilização do sistema de saúde pública (KARMALI, 1989). Além do impacto na rede de saúde, a ocorrência destas infecções gera perdas econômicas significativas ao justificar a imposição de barreiras ao comércio internacional de alimentos, especialmente prejudiciais aos países exportadores de carnes, leite e derivados.

Na América Latina, países como no Chile, no Uruguai e especialmente na Argentina, foram registradas elevadas frequências de doença humana e de colonização do reservatório animal. No Brasil, são poucos os relatos de casos de doença humana por STEC (CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al 2002a; GUTH et al., 2002b; IRINO et al., 2002). inclusive representantes dos sorotipos O157:H7 e

O111:H-, já detectados em casos de doença humana em nosso país (CERQUEIRA et al., 1997; 1999; GONZALEZ, 2003; TRISTÃO, 2007).

Segundo Ethelberg et al. (2009), as STECs pertencentes ao sorogrupo O26 são a segunda mais frequentemente isoladas depois da O157 nos Estados Unidos, Ásia e Europa em casos de SHU. Em estudos de 1988 a 2004, cepas de STEC O26 foram responsáveis por 21,1% dos casos de SHU em pacientes pediátricos na Itália (BONARDI et al., 2005).

Por mais que poucos casos de doenças humanas associados à STEC tenham sido descritos no Brasil, é grande a ocorrência deste patógeno em nosso rebanho bovino. Há ainda a proximidade com a Argentina, país onde a SHU é endêmica (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007), o que pode ter influência dos hábitos alimentares característicos do país como o consumo extensivo de carne mal cozinha, carne preparada em domicílio, além de preparações a base de caldo de carne (RIVAS et al., 2008).

A alarmante expansão das infecções por STEC verificada nos últimos anos é atribuída a uma conjunção de fatores, entre os quais as práticas modernas de criação intensiva de animais, as mudanças nos hábitos alimentares das populações urbanas, as diminutas doses infectantes requeridas (cerca de 100 células para os sorotipos O157:H7 e O111:H-) e a incapacidade dos procedimentos convencionais de inspeção de alimentos (sensoriais) detectarem o patógeno (GONZALEZ, 2003).

De qualquer maneira, muitos sorotipos de STEC não-O157 isolados de alimentos e animais não estão envolvidos em doença humana (JOHNSON et al., 1996; SMITH et al., 1991), sendo difícil a diferenciação das STEC não-O157 patogênicas isoladas destas fontes.

A ocorrência de STEC não-O157 em alimentos e fezes de animais é maior do que a de STEC O157:H7. Em função desses dados os pesquisadores concluíram que embora os humanos estejam mais expostos a STEC não-O157 do que a STEC O157:H7, a incidência de infecção por STEC não-O157 parece consideravelmente menor do que por STEC O157:H7 (JOHNSON et al., 1996). Admite-se que STEC O157:H7 é mais virulenta ou mais transmissível do que STEC não-O157 ou ainda que STEC não-O157 poderia causar formas brandas de doença, as quais não despertariam a atenção médica (LAW, 2000).

Atualmente, verificou-se o aumento global na ocorrência de infecção por STEC, incluindo locais onde não existiam relatos prévios de sua presença, como, México e China (DOYLE, 1991) e América do Sul (CORDOVÉZ et al., 1992; GUTH et al., 2002a; IRINO et al., 2002; LOPEZ et al., 1989; PRADO et al., 1995).

Embora seja alta a incidência de SHU na Argentina (BERTÃO, SARIDAKIS, 2007), no Brasil casos esporádicos de diarreia e SHU associados à infecção por STEC foram relatadas (CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al., 2002b; IRINO et al., 2002; NISHIMURA et al., 2005; VAZ et al., 2004). Casos escassos de STEC em alimentos foram reconhecidos (BERGAMINI et al., 2007; CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997), talvez pela dificuldade de detecção quando esse microrganismo está presente em número pequeno devido, por exemplo, à interferência da microbiota do leite (GARCIA et al., 2008).

2.3 VIRULÊNCIA DE STEC

A toxina *Stx* ainda é considerada como o principal fator de virulência nas STEC (CAPRIOLI et al., 2005; PATON; PATON, 1998b), sendo subdividida nos tipos 1 (*Stx1*) e 2 (*Stx2*) (CAPRIOLI et al., 2005; MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998). *Stx1* inclui duas variantes (*Stx1* e *Stx1c*), enquanto *Stx2* possui múltiplas variantes (*Stx2*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f*), distintas na sequência de aminoácidos da subunidade B (BASTIAN et al., 1998; BRETT et al., 2003).

Além da toxina Shiga, STEC possui outros fatores de virulência e diferentes ilhas de patogenicidade (HACKER; KAPER, 2000) e, entre as quais, destaca-se a chamada região *Locus of Enterocyte Effacement (LEE)*, a qual codifica para todos os elementos necessários para a adesão e destruição das microvilosidades intestinais, levando a um quadro histopatológico denominado lesão *Attaching and Effacing (A/E)* (NATARO; KAPER, 1998).

A lesão *A/E*, classificada inicialmente em cepas de EPEC, é caracterizada basicamente pela destruição das microvilosidades, aderência íntima entre a bactéria e a membrana da célula hospedeira com o acúmulo de filamentos de actina e, conseqüentemente, formação de uma estrutura semelhante a um pedestal sob a bactéria. Os genes bacterianos, como adesina intimina (*eae*) e receptor de intimina, *Tir (tir)*, são alguns dos genes presentes na região *LEE*, citada anteriormente (FRANKEL et al., 1998; NATARO; KAPER, 1998). No entanto, diversos

pesquisadores já demonstraram formas alternativas de compensar a ausência do locus *LEE*, como a expressão de uma adesina autoaglutinante de STEC (*Saa*), codificada em um plasmídio de alto peso molecular e descrita em cepas de STEC O113:H21 (PATON et al., 2001). Essa adesina, aparentemente capaz de mediar a aderência bacteriana a células epiteliais *in vitro*, posteriormente mostrou-se mais relacionada a STEC *LEE*-negativas de origem bovina do que de origem humana (JENKINS et al., 2003), levando-se a hipótese de que *Saa* poderia desempenhar um papel na colonização do intestino bovino por STEC, suprimindo a ausência da região *LEE*.

Tem-se observado que vários sorotipos de STEC possui a capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em grande variedades de superfície de contato, de materiais abióticos, usados nas plantas de processamento de alimentos (WANG et al., 2012).

A adesão bacteriana é influenciada pelas propriedades físico-químicas das superfícies celulares, que por sua vez são influenciadas por fatores como, taxa de crescimento microbiano, meio e condições de cultivo (tempo e temperatura). As bactérias têm superfícies com cargas negativas e normalmente se comportam como partículas hidrofóbicas, mas o grau de hidrofobicidade pode mudar com a fase de crescimento (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Cepas de STEC O157 e STEC não-O157 envolvidas em doença humana carregam um plasmídio de aproximadamente 60 MDa. Entre os presumíveis fatores de virulência codificados neste plasmídio, foram citados genes responsáveis pela codificação da citotoxina denominada enterohemolisina, EHEC-hemolisina ou *E-Hly*, (*ehxA*) e uma serina-protease (*EspP*), proteína auto-transportadora codificada pelo gene *espP* que clivaria o fator V da coagulação humana (BURLAND et al., 1998, LEBLANC, 2003; LEVINE et al., 1987). Apesar de não se ter ainda comprovado o envolvimento de *E-Hly* na patogênese de STEC, sabe-se que pacientes com SHU desenvolvem anticorpos contra a hemolisina (SCHMIDT; KARCH, 1996). Cogita-se que a lise de eritrócitos *in vivo* possa contribuir para a multiplicação da bactéria, por aumentar a disponibilidade de ferro (NATARO; KAPER, 1998).

2.4 STEC DO SOROTIPO O153:H25; O113:H21 E O111:H8

Com base na presença da região *LEE*, pode-se determinar dois grupos para as STEC: cepas *LEE*-positivas – com destaque para os sorotipos O157:H7, O153:H25 e O111:H8 – e cepas *LEE*-negativas, cujo sorotipo mais comumente associado à doença humana é O113:H21. Cepas do sorotipo O113:H21 destacam-se pela ocorrência em casos esporádicos e em alguns surtos de diarreia, CH e SHU (BRETT et al., 2003; GOLDWATER; GILES; BETTELHEIM, 1998; PATON; PATON, 1998b; PATON; PATON, 1999). Esse sorotipo foi relatado em surtos como o ocorrido em Adelaide, no sul da Austrália (KARMALI, 1989; PATON; PATON, 1998; PATON; PATON, 1999). STEC *LEE*-negativas não produzem a lesão A/E, sendo aparentemente menos virulentas; entretanto, diversos casos esporádicos de diarreia, SHU e CH já foram descritos (BOERLIN et al., 1999; BONNET et al., 1998; KESKIMÄKI et al., 1997; PATON; PATON, 1998a;).

Apesar de não possuírem o locus *LEE*, que confere uma aderência íntima da bactéria, cepas de STEC O113:H21 são capazes de aderir ao epitélio intestinal, mas sem recrutamento detectável de elementos do citoesqueleto, observado em cepas *LEE*-positivas como EPEC e EHEC O157 (DYTOC et al., 1994). Além disso, já foi observado que STEC O113:H21 é capaz de invadir células humanas como Caco-2 e HCT-8, suspeitando-se que cepas *LEE*-negativas podem empregar mecanismos de invasão para colonizar a mucosa intestinal do hospedeiro (LUCK et al., 2005).

É notada a ausência de relatos de doenças em humanos no Brasil por STEC O113:H21 e O153:H25, porém, esses sorotipos são encontrados com grande frequência em reservatórios animais no país (GUIMARÃES, 2009), o que foi constatado por alguns pesquisadores (GONZALEZ, 2003; IRINO et al., 2005).

Diversos sorotipos de *E.coli* não-O157 já foram isolados de produtos cárnicos e de carcaças, conhecidas por causarem doença em humanos, inclusive SHU. Entre as quais: O2:H8, O2:H29, O5:H-, O14:H-, O20:H19; O22:H8, O26:H11, O50:H7, O91:H21, O91:H-, O103:H2, O104:H-, O105:H18, O111:H-, O113:H21, O117:H4, O121:H19, O128:H2, O128:H2, O128ab:H2, O137:H4, O145:H-, O153:H25, O163:H19, O165:H25, O165:H-, O174:H21, OX3:H2, OX3:H21, OUT:H2 e OUT:H- (HUSSEIN; BOLLINGER, 2005).

2.5 CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas causadas por EHEC podem variar de diarreia branda, não sanguinolenta, até CH, SHU e Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT). O período de incubação é, geralmente de três a quatro dias, embora períodos de incubação longos, como de cinco a oito dias, ou curtos, de um a dois dias têm foram descritos em alguns surtos (NATARO; KAPER, 1998).

A queixa inicial é geralmente diarreia não sanguinolenta, embora em muito pacientes, seja precedida de febre de curta duração e dores abdominais. Vômitos acontecem em cerca de metade dos pacientes no período da diarreia não sanguinolenta e/ou em outros momentos da doença. Dentro de um a dois dias a diarreia torna-se sanguinolenta e as dores abdominais aumentam e esse estágio normalmente dura de quatro a 10 dias. Em muitos pacientes a diarreia sanguinolenta desaparece sem nenhuma sequela aparente, mas em 10% dos casos dos pacientes jovens, menores que 10 anos (e em idosos) a doença pode avançar para SHU (RILEY et al., 1983).

SHU é definida pela tríade: anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal. As manifestações clínicas iniciais incluem oligúria ou anúria, edema, palidez e algumas vezes convulsões. A maioria dos pacientes se recupera com terapias adequadas, mas, de 3 a 5% dos afetadas morrem, e 12 a 30% ficam com sequelas, tais como falência renal, hipertensão ou manifestações do sistema nervoso central (GRIFFIN, 1991).

A PTT é caracterizada por dano ao endotélio, fragmentação e destruição dos glóbulos vermelhos, destruição das plaquetas e inadequado suprimento de sangue aos tecidos. Os rins são especialmente susceptíveis a tais danos vasculares, mas o cérebro, intestino e outros órgãos também podem ser afetados (FRATAMICO et al., 2002). A diferença entre SHU e PTT não é clara. Na PTT, existe deficiência de uma proteína no plasma, chamada de fator de Willebrand que causa uma condição caracterizada por sangramento excessivo que tende a afetar adultos e não crianças (ECHEVERRY, 2004).

A EHEC está espalhada ao redor do mundo, mas a maior parte dos casos de doença foi relatada em nações industrializadas dos hemisférios norte e sul. Na Argentina e Chile, a SHU é maior causa de falha renal em crianças (CORDOVEZ et

al., 1992; RIVAS et al., 1998). Nos Estados Unidos, EHEC foi associada a, aproximadamente, 74.000 casos de infecção e 61 mortes, anualmente (MEAD et al., 1999).

No Brasil, o primeiro relato de isolamento de EHEC de um paciente com SHU ocorreu em um hospital da cidade de São Paulo, no ano de 2001, envolvendo uma criança, com história de diarreia aguda ocorrida três semanas antes da internação, cujos sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais levaram ao diagnóstico desta síndrome. A cepa isolada pertencia ao sorotipo O26:H11 (GUTH et al., 2002a).

2.6 RESERVATÓRIO ANIMAL E TRANSMISSÃO

STEC pode ser encontrada no intestino de animais sadios e são excretadas nas fezes de uma variedade de animais incluindo bovinos, caprinos, suínos, cães, gatos, galinha, entre outros. O gado é um dos mais importantes reservatórios de STEC, e altas taxas de colonização, por STEC, foram observadas no rebanho bovino de muitos países (BURNENS et al., 1995; GRIFFIN et al., 1991; HANCOCK et al., 1994; WELLS et al., 1991), incluindo o Brasil (CERQUEIRA et al., 1999; GONZALEZ, 2003; SILVA JUNIOR, 2002; TRISTÃO, 2007).

A transmissão de STEC acontece por alimentos e água contaminada e, menos frequentemente, pessoa-a-pessoa. Muitos casos de infecção são causados especialmente por alimentos de origem bovina (NATARO; KAPER, 1998).

Vários autores relataram a contaminação de produtos lácteos por STEC. MORGAN et al., 1993 relacionaram casos de infecção humana, ocorridos no noroeste da Inglaterra, provocados por STEC do sorotipo O157:H7 com o consumo de iogurte produzido localmente com leite integral pasteurizado, onde sessenta casos foram identificados no período de 1 de setembro a 1 de novembro de 1991. No ano de 2001, em Edmonton, Canadá; ocorreu um surto envolvendo EHEC O157:H7 que foi associado ao consumo de queijo “gouda” não pasteurizado (HONISH et al., 2005).

2.7 TRANSMISSÃO DE STEC

A maioria dos animais colonizados por STEC são assintomáticos, mas algumas cepas de STEC podem estar associadas com diarreia em bezerros neonatos (NATARO; KAPER, 1998). Este grupo bacteriano possui, em geral, uma

marcante capacidade de sobrevivência quando excretado nas fezes bovinas, fazendo com que seja importante fonte de reinfecção do gado e possível fonte de contaminação do ambiente (GUDONG; ZHAO; DOYLE, 1996). Adicionalmente, Hussem; Sakuma (2005), relataram que o ambiente contaminado de fazendas leiteiras pode persistir como fonte de infecção de STEC por vários meses.

Acredita-se que o estresse seja responsável pela disfunção das defesas imunológicas, levando ao aumento da susceptibilidade às infecções (SALAK-JOHNSON; MCGLONE, 2007). Brown-Brandl et al.(2009), investigaram o efeito do estresse pelo calor e manipulação em bezerros confinados na prevalência e concentração de *E. coli* e *E coli* O157:H7 em fezes. Esses autores concluíram que nenhuma evidência foi encontrada sugerindo relação entre os estresses avaliados em bezerros e as cepas estudadas e sua concentração e prevalência nas fezes.

A ocorrência de STEC em bovinos tem sido amplamente relatada na literatura. Foram isoladas STEC em amostras fecais de bovinos e suínos no Chile (RIOS et al., 1999). Na Austrália, STEC foi isolada em 13% das amostras de fezes bovinas (ROBINS-BROWNE; ELLIOTT; DESMARCHELIER, 1998). Na França Fremaux et al. (2006), pesquisando amostras de fezes, em fazendas leiteiras, encontraram o gene *stx* em 35% das fezes. Leotta et al. (2006), encontraram uma frequência para STEC de 50,8% em fezes de mamíferos selvagens de um zoológico e de um jardim botânico na Argentina, sendo que, nesse país, STEC está presente principalmente em gado de corte.

No Brasil, Yano et al. (1986), estudando bezerros com diarreia na região Centro-Oeste, observaram que 70% das *E. coli* isoladas eram produtoras de *Stx*. Já Cerqueira et al. (1999), observaram que 71% das amostras fecais bovinas da região Metropolitana do Rio de Janeiro abrigavam o gene *stx*. Tristão et al. (2007), identificaram linhagens STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro. Em pesquisa realizada no Estado do Rio de Janeiro com 1221 amostras fecais de bovinos sadios ficou demonstrado que 61% dos animais carregavam STEC (JOAQUIM, 2002). No estado de Minas Gerais, Oliveira et al. (2007) observaram a presença de STEC em amostras fecais de búfalos, variando de zero a 64%, de acordo com o local. Em rebanhos do Paraná, Pigatto et al. (2008) encontraram 36% de STEC em fezes de bovinos sadios de 33 diferentes sorotipos. Entre os genes encontrados, o *stx1* estava presente em 10 % dos isolados, *stx2* em 43%, *stx1* e

stx2 em 47% e *eae* em 1%. No mesmo estado, Farah et al. (2007), detectaram em 57% das fezes bovinas a presença de STEC. No estado do Rio Grande do Sul, Tristão et al. (2007) detectaram STEC em 28% destas amostras, sugerindo que bovinos saudáveis no Brasil podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Animais infectados por STEC podem ser incluídos na produção de alimentos, como consequência, produtos de origem animal como carne, leite e derivados são fontes potenciais de contaminação por STEC (HUSSEIN; SAKUMA, 2005). A primeira descrição do isolamento de STEC associado à doença e recuperado de alimentos foi feita por Riley et al. (1983), que isolaram um sorotipo até então raro de *E. coli* (sorotipo O157:H7) de um surto de doença gastrointestinal, caracterizada por dores abdominais severas, diarreia aquosa seguida por um quadro de diarreia sanguinolenta e pouca ou nenhuma febre. Esse surto foi associado à ingestão de hambúrguer mal-cozido de uma cadeia de “fast-food” nos Estados Unidos. Outras preparações de carne bovina (GRIFFIN, 1998), além de carnes de suínos, de frangos e de ovinos (DOYLE; PADHYE, 1989) podem veicular STEC.

Ainda que a carne seja o alimento mais associado a contaminação, produtos derivados de animais como o leite e derivados já foram relatados como fonte de infecção. Outros alimentos sujeitos à contaminação por fezes bovinas também são um risco, como frutas e vegetais crus, maionese, suco de maçã não pasteurizado e salame (PATON; PATON, 1998b). Além disso, fontes como água de consumo humano, água de piscina e o contato com animais contaminados também devem ser considerados (GYLES, 2007). É importante destacar que o processo de corte da carne pode ser responsável pela contaminação cruzada de outros alimentos com STEC (GRIFFIN, 1998). Essa contaminação é facilitada pelo contato das vísceras com a carne e superfície dos equipamentos (CDC, 2000). O contato entre pessoas é outro importante modo de transmissão pela rota fecal-oral, inclusive através de portadores assintomáticos (GYLES, 2007). A maioria dos estudos sobre a ocorrência de STEC em alimentos relaciona-se com surtos alimentares. Tem-se observado que vários sorotipos de STEC tem a capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em grande variedades de superfície de contato, de material usados nas plantas de processamento de alimentos (WANG et al., 2012).

Biofilmes bacterianos são normalmente mais tolerantes aos agentes sanitizantes do que as células bacterianas livres da mesma espécie, então isso dificulta a completa inativação do biofilme formado nos equipamentos e no ambiente,

as células podem se destacar do Biofilme e contaminar os produtos (WANG et al., 2012).

A forte adesão dos biofilmes de STEC a superfície também pode afetar a eficiência da aplicação de antimicrobianos para reduzir a contaminação. Assim, a formação de biofilme de STEC é um sério risco potencial na higiene de alimentos e pode ser uma fonte de contaminação cruzada no ambiente de processamento de alimentos (WANG et al., 2012).

Há poucos dados sobre a ocorrência de STEC em alimentos no Brasil. No Rio de Janeiro, 20% das amostras de carne moída crua apresentavam STEC (CERQUEIRA et al., 1997) e, em São Paulo, 3,5% das amostras (BERGAMINI et al., 2007). GONZALEZ et al., 2000 detectaram STEC em carcaças de frango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Contudo, neste mesmo estudo, não isolaram STEC nas amostras de queijo Minas Frescal examinadas. No Paraná, Timm et al. (2009) não detectaram STEC das 464 cepas de *E. coli* isoladas nas amostras de carne moída e leite cru.

2.8 CONTAMINAÇÃO DE STEC EM LEITE E DERIVADOS

O leite é um alimento consumido extensivamente pela população brasileira, sendo importante na dieta de adultos e crianças e considerado o mais completo alimento natural. O Brasil ocupa a quarta posição entre os maiores produtores de leite do mundo (FAO, 2013). Admite-se que, a despeito do impedimento legal, parte significativa do leite cru chegaria a consumidores e seria empregado na fabricação de produtos lácteos, oferecendo riscos de transmissão de patógenos e zoonoses pelo leite. Portanto, existe uma grande possibilidade de que o leite não processado possa veicular agentes infecciosos, inclusive STEC. Além disso, devido à sua composição química, o leite é um produto com grande facilidade de contaminação por microrganismos (CHYE; ABDULLAH; AYOB, 2004; DOYLE et al., 1997). Em estudo sobre leite cru produzido por pequenos produtores de cinco estados brasileiros, Nero et al. (2004), encontraram *E coli* em 36,8% da amostragem investigada. Embora os autores não definiram a origem do microrganismo, é razoável admitir que provenham majoritariamente do intestino bovino, onde a colonização por STEC é muito frequente. Outros investigadores relataram o isolamento de STEC do rebanho leiteiro nacional ou mesmo do leite (CERQUEIRA

et al., 1999; IRINO et al., 2005; LIRA et al., 2004; MOREIRA et al., 2003). É importante considerar o risco de contaminação do leite por microrganismos patogênicos durante a ordenha. Essa contaminação é influenciada por fatores como as condições climáticas da região, a higiene do manipulador, o ambiente, os utensílios e os equipamentos utilizados no processo.

Os produtos lácteos são alimentos que possuem o leite como a principal matéria prima em sua composição (Tabela 1). No Guia Alimentar para a População Brasileira, formulado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), consta que é necessário o consumo de três porções diárias de leite e derivados por dia, por serem fontes de proteínas, vitaminas e cálcio, sendo este último nutriente, importante para a formação e manutenção da massa óssea. O consumo global de leite e de outras bebidas derivadas chegou a um pico de 258 bilhões de litros em 2008, conforme pesquisa da Tetra Pak. Apesar da crise econômica global, a previsão é que o consumo mundial de laticínios continue a crescer a uma taxa anual de 2,2% até 2012 (TETRA PAK, 2009).

O queijo Minas frescal é o terceiro queijo mais produzido no Brasil (SIMEÃO et al., 2013). É classificado como queijo macio e caracteriza-se pela alta atividade de água (0,99), pH em torno de 6,8 e 1,6 % de Cloreto de Sódio (NaCl) (CARVALHO, 2003; FREITAS et al., 1993; TRONCO, 2003; WALSTRA et al., 2001). Possui cerca de 43 a 55% de umidade, devendo ser consumido nos primeiros 15 dias após sua fabricação sendo, portanto, um produto altamente perecível (CAMPOS et al., 2006; HOFFMAN; SILVA; VINTURIM, 2002). No entanto alguns autores apontaram, ainda, a validade comercial acima de 15 dias (SANGALETTI et al., 2007). O QMF deverá manter-se a uma temperatura não superior a 8°C (SILVA JÚNIOR, 2002; MAPA, 1997). Apesar da legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado no preparo do QMF, é frequente a comercialização de um produto que não atenda a essa especificação legal (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001). Análises de QMF no varejo têm revelado importantes problemas de higiene na maioria das amostras analisadas (ARAÚJO et al., 2001a,b; ARAÚJO et al., 2002; BRANT; FONSECA; GONZALEZ et al., 2000; SILVA, 2007)

Na Tabela 1 consta a composição dos principais produtos lácteos.

Tabela 1. Composição dos principais produtos lácteos

Alimento	pH	Aa	% lactose	% proteína	% gordura	% cinzas
Leite de vaca	6,8 ^a	0,99 ^b	4,9 ^a	3,9 ^a	3,9 ^a	0,7 ^c
QMF	6,4 ^d	≥ 0,98 ^m	4,3 ^e	12 a 18 ^f	20,5-29,2 ^g	3,6-4,3 ^h
Queijo prato	5,2-5,4 ⁱ	0,94-0,96 ^m	1,8 ^j	25,5 ^j	29 ^j	3,5 ^j
logurte	5 ^l	0,97 ^l	2,2 ^l	3,5 ^l	3,0 ^l	0,5 ^l
Soro de queijos ^k	6,5	0,92	5	0,91	0,36	0,52

Nota: ^a TRONCO, 2003; ^b WALSTRA et al., 2001; ^c MODLER, 2000^d CARVALHO, 2003; ^e ANDREATTA et al, 2006; ^f MACHADO et al., 2004; MARQUES, OLIVEIRA, 2004; ^g ROSA, 2004; ^h ANDREATTA et al., 2009ⁱ FURTADO, LOURENÇO, 1994 ^j HOHENDORFF, SANTOS, 2006 ^k MODLER, 2000; OLIVEIRA, 1986; ^lTAMINE, ROBSON, 1991 ^mLEWIS, 1993.

Estudos relacionados à contaminação por STEC em leite e derivados são escassos apesar do elevado número de surtos envolvendo esses alimentos. O principal meio de transmissão de STEC no leite ocorre pelas fezes durante a ordenha (CHIUEH; LIU; SHIH, 2002). Padhye; Doyle (1991), detectaram *E. coli* O157:H7 em amostras de leite cru e queijo. Isolados de STEC também foram encontrados nesses produtos no Canadá, Bélgica, Alemanha, Reino Unido e nos Estados Unidos (WHO, 1998).

É importante o destaque para a mastite no rebanho leiteiro em decorrência da precária higiene durante a ordenha, o que foi observado por Lira et al. (2004), onde 12% das amostras de leites estavam contaminados por STEC. A presença destes patógenos no ambiente pode contribuir para a elevada contaminação de leite e, conseqüentemente, de produtos lácteos como queijos frescos produzidos com leite não pasteurizado (GERMANO; GERMANO, 1995; OMBUI et al., 1994).

É importante considerar que GOVARIS; KOIDIS; PAPANICOLAOU (2002), em seu estudo, sugerem que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em produtos lácteos, e que medidas de controle na fabricação destes produtos são essenciais para diminuir o risco de contaminação. Existe uma falta de padronização na produção de produtos lácteos devido, principalmente, à deficiência em

fiscalização nas indústrias brasileiras. Portanto, os cuidados higiênicos sanitário devem começar desde a ordenha até a distribuição dos produtos (ROCHA et al., 2006). Dentre os quais destacam-se os cuidados com o úbere, os hábitos higiênicos do ordenhador, do ambiente, além de cuidados com o armazenamento do leite coletado, devendo estar sob refrigeração no local de ordenha (TRONCO, 2003).

2.9 FATORES QUE AFETAM O DESENVOLVIMENTO DE *E. coli* EM ALIMENTOS

O comportamento dos microrganismos nos alimentos é determinado pelas propriedades desses produtos (pH e atividade de água "Aa", dentre outros) e pelas condições de estocagem (temperatura, umidade relativa e composição da atmosfera) (NAKASHIMA, 2000). O desenvolvimento de *E. coli* em alimentos é dependente da interação desses fatores intrínsecos e extrínsecos, além da competição com outros microrganismos (BUCHANAN; DOYLE, 1997; VARMAN; EVANS, 1996). Com ênfase na temperatura, o padrão de desenvolvimento de *E. coli* situa-se na faixa de 7 °C a 48 °C com o ótimo em temperatura de 37 °C. Porém, existem exceções que envolvem as cepas patogênicas (VARMAN; EVANS, 1996). Alguns pesquisadores têm relatado que a temperatura mínima de crescimento para *E. coli* O157:H7 é aproximadamente 8-10 °C (BUCHANAN; BAGI, 1994; RAJKNOWSKI; MARMER, 1995).

A concentração hidrogeniônica, que determina o pH dos alimentos, é um dos principais fatores que exercem influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição dos microrganismos, que se encontram presentes nas matrizes alimentícias (SILVA, 2000). Referindo-se ao valor de pH, na "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF, 1980) está descrito que *E. coli* é capaz de multiplicar-se bem na faixa compreendida entre 4,0 e 9,0. Para Varman; Evans (1996), existem interações entre o pH e outros fatores incluindo temperatura, Aa e natureza do acidulante. O pH mínimo para o desenvolvimento de *E. coli* é 4,0-4,5 (BUCHANAN; BAGI, 1994), sendo esse dependente da interação com outros parâmetros de crescimento. A sobrevivência dos patógenos em alimentos ácidos tornou-se importante depois de relatos de surtos de *E. coli* O157:H7 em alimentos de baixo pH como maionese, cidra e sucos de maçã e laranja pasteurizados (ZHAO; DOYLE, 1993), sendo que em temperatura de

refrigeração, a sobrevivência nesses alimentos é prolongada (BUCHANAN; DOYLE, 1997). A tolerância ácida está associada à expressão de genes que são regulados pelo fator *Sigma* - um importante regulador atuante no final da fase log e na fase estacionária de crescimento codificado pelo gene *rpoS* - muitos outros genes que codificam fatores protetores de condições adversas podem estar sendo simultaneamente expressos. O fator *Sigma* contribui para a proteção de *E. coli* em condições ambientais adversas como falta de nutrientes, hiperosmolaridade, dano oxidativo e radiação UV (SMALL et al., 1994).

A *E. coli* apresenta condições ótimas de Aa 0,95 (PRESSER et al., 1998; VARMAN; EVANS, 1996). Embora a sobrevivência de *E. coli* seja inibida pela baixa Aa dos alimentos, muitos surtos de STEC O157:H7 em alimentos secos já foram descritos (HIRAMATSU et al., 2005). A multiplicação de *E. coli* em níveis elevados de NaCl também induz a expressão do gene *rpoS*, associado ao aumento na termotolerância e resistência ao peróxido de hidrogênio (HENGGE-ARONIS et al., 1992).

Algumas cepas de STEC são altamente resistentes ao estresse físico-químico, assim como à acidez e ambientes secos, e podem sobreviver por longos períodos no solo, estrume e água (LOUKIADIS et al., 2006; MAULE, 2000). *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por muitas semanas quando dessecada, mesmo sob temperatura de refrigeração (BAGI; BUCHANAN, 1993).

2.10 FORMAÇÃO DE BIOFILME

As superfícies ou utensílios que entram em contato com os alimentos, não deveriam contaminar os produtos durante o processamento e industrialização, porém sabe-se que em determinadas situações microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes depositam-se, aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. (ANDRADE et al., 2008). Algumas definições são importantes no estudo de biofilme: quando as células estão livres, são designadas planctônicas e quando estão associadas a uma superfície em processo de adesão e formação de biofilmes são denominadas sésseis (ANDRADE et al., 1998). A adesão e formação de biofilme por microrganismos deterioradores ou patogênicos em contato com as superfícies nas plantas de processamento de alimentos, é um problema de saúde pública, devido a contaminação cruzada (RYU; BEUCHAT, 2005).

A formação de biofilmes é resultado de vários fenômenos de natureza física e biológica, constituindo-se em várias etapas. Na literatura há diversas teorias que tentam explicar a formação do biofilme. Zotolla; Sasahara (1994), descreveram o processo em duas etapas, sendo a primeira reversível e a segunda irreversível. Na etapa reversível, os microrganismos estariam fracamente ligados à superfície por forças de Van der Waals e atrações eletrostáticas, sendo facilmente removidos. Na segunda etapa, pelo tempo de aderência (tempo-dependente) e pela formação de substâncias exopoliméricas que funcionam como uma “cola” ligando a bactéria à superfície, o fenômeno torna-se irreversível. Alguns fatores influenciam a adesão microbiana como, por exemplo, as propriedades físico-químicas da superfície inerte e da superfície microbiana, estruturas celulares (pili, flagelos e fímbrias), capacidade de produção de matriz extracelular, sistemas de comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e condições do processamento de alimentos (fluxo de líquidos e concentração de nutrientes). *Quorum sensing* é um mecanismo de sinalização célula-célula que pode modular algumas funções celulares, incluindo produção de bacteriocina, fatores de virulência e formação de biofilme. A regulação desse sistema é mediada pelo acúmulo de uma ou mais classes de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula bacteriana e excretadas para o meio externo denominados autoindutores (AI). Estas moléculas quando atingem uma concentração crítica são detectadas pelas bactérias que respondem a este sinal, alterando a expressão de determinados genes (READING; SPERANDIO, 2006; WATERS; BASSLER, 2005). A interferência e a ruptura do sistema *quorum sensing* é denominado como sistema *quorum quenching* (MARTINEZ et al., 2007; ULRICH, 2004; ZHANG, 2003). Alguns mecanismos que interferem nesse sistema de comunicação têm sido descritos. Os mais estudados são as lactonases, acilases e furanonas, embora haja alguns trabalhos nos quais são indicadas outras substâncias como possíveis interferentes no sistema *quorum sensing* (CHOO; RUKAYADI; HWANG, 2006; RASMUSSEN et al., 2005; ZHANG, 2003). Além destes fatores outros são importantes como o gênero e a espécie do microrganismo, a temperatura e as condições de crescimento (FOLSOM et al., 2006 KIM; FRANK, 1995; LINDSAY et al., 2006; SANDERS et al., 2008; STEPANOVIĆ et al., 2004). As bactérias têm superfícies com cargas negativas e normalmente se comportam como partículas hidrofóbicas, mas o grau de hidrofobicidade pode mudar com a fase de crescimento (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Outro fator extremamente importante na adesão e

formação de biofilmes é a característica da superfície sólida a qual os microrganismos irão aderir. Chapas de aço inoxidável tipo AISI 304 acabamento nº4 (#4) são usualmente utilizadas na fabricação de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos. Borracha, teflon e nylon são utilizados para gaxetas, utensílios e partes de equipamentos. Além destas superfícies, destacam-se também o vidro e as superfícies de polipropileno. Estas superfícies são submetidas a repetidas e diferentes ações mecânicas nas diversas etapas de processamento e higienização, aumentando o desgaste e a possibilidade de alojar microrganismos. O fator mais relevante na fixação e na proteção dos microrganismos nas superfícies é a produção de substâncias extracelulares. Os exopolissacarídeos (EPS) determinam as condições de vida dos microrganismos no biofilme, afetando a porosidade, densidade, conteúdo de água, propriedades de absorção e estabilidade mecânica. Estes compostos são biopolímeros que envolvem os microrganismos no biofilme. Ao contrário do que normalmente se acredita, os EPS são mais do que apenas polissacarídeos, os quais compreendem adicionalmente uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas e glicolipídeos, sendo difícil purificar a matriz de EPS e separar seus componentes de células e outras macromoléculas associadas ao biofilme (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007). Os EPS também protegem as células contra estresses de ordem física como, ação mecânica, irradiações e variações de temperatura, além de sanitizantes e antimicrobianos (POULSEN, 1999). Microrganismos aderidos a superfícies de contato com alimentos podem constituir um perigo potencial pela possível contaminação cruzada no processamento desses alimentos (POULSEN, 1999; SHI; ZHU, 2009). Diversos pesquisadores descreveram a habilidade dos microrganismos de origem alimentar aderir e formar biofilmes em superfícies (GANDARA; OLIVEIRA, 2000; JAIN; CHEN, 2007; SHARMA; ANAND, 2002). Quando as células do biofilme se desprendem, os microrganismos podem contaminar os alimentos e/ou serem disseminados para outros pontos da superfície, equipamentos e ambientes (POULSEN, 1999). Sharma e Anand, 2002 avaliaram a formação de biofilmes em uma usina de pasteurização comercial de leite. Dentre os microrganismos isolados predominaram os do gênero *Bacillus*. Também foram isolados *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e espécies de *Citrobacter*, *Flavobacterium* e *Proteus*. Segundo Meyer, 2003 existem três estratégias para se tentar solucionar os problemas dos biofilmes: i) sanitização antes

da sua formação, ii) sanitização após sua formação, ou iii) utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos. A limitação de nutrientes, a ausência de água, o uso de equipamentos com configurações higiênicas, o controle da temperatura no processamento são condições importantes para o controle do biofilme na indústria de alimentos. Entretanto, nem sempre estas condições estão presentes, e, portanto, o controle dos biofilmes, muitas vezes, só ocorrerá pela aplicação de um programa de higienização eficaz (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Prevenção, remoção e inativação de biofilme de STEC são críticos para melhorar a higiene, controle de contaminação e aumentar a segurança dos alimentos (WANG et al, 2012). Os sanitizantes químicos mais utilizados no controle de microrganismos em superfícies de processamento na indústria de alimentos são o hipoclorito de sódio, cloraminas orgânicas, dióxido de cloro, iodóforos, compostos de amônia quaternária, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, álcool-clorexidina, etc (ANDRADE et al., 2008). Gândara e Oliveira (2000), relataram que os melhores resultados na remoção de biofilme em aço inoxidável, formado por *Streptococcus thermophilus* isolado de leite pasteurizado, foram obtidos com limpeza alcalina seguida de limpeza ácida e mais eficientemente quando se complementava a higienização com hipoclorito de sódio. Marques et al. (2007), avaliaram a ação do dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético na inativação de células de *S. aureus* aderidas e verificaram uma maior eficiência do ácido peracético. A prevenção e o controle da formação de biofilmes na indústria de alimentos passam pelo correto estabelecimento de programas de higienização, cuja eficácia dependerá de uma aplicação integrada às outras ferramentas de controle de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o Sistema de Análise e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e ISO: 9000 (SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009) e Boas Práticas de Produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite (SANTOS, 2007).

Nas mais diversas indústrias de processamento de alimentos, outros microrganismos aderidos às superfícies que contatam alimentos, já foram identificados, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus* (GUNDUZ ; TUNCEL, 2006; HOOD; ZOTOLLA,1995).

3. DESENVOLVIMENTO

ARTIGO 1. 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^I, Thalita Martins da Silva^{II}, Luciana Maria Ramires Esper^{II} Alice Gonçalves Martins Gonzalez^{II}, Robson Maia Franco^I

^I Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil. E-mail: pglima@id.uff.br

^{II} Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, UFF, Niterói, RJ, Brasil

(Aceito para publicação na revista Ciência Rural 31.07.2014CR-2013-1678.R2)

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 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, pertencentes à coleção de *E. coli* patogênicas do laboratório de Higiene e Controle Microbiológico da Alimentos (GONZALEZ, 2003). A identificação destes microrganismos foi confirmada através de testes bioquímicos e morfológicos. Inóculos de 10^3 e 10^5 células 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°C , adicionaram-se 200ppm de 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 consequente liberação de soro. Procedeu-se à mexedura a 42°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°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 psicotróficos 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°C e analisados quanto à recuperação de células viáveis de *E.coli* (KORNACKI; JOHNSON, 2001), assim como contagem de psicotróficos 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°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 psicotróficos variou de $3,6 \times 10^4$ UFCg⁻¹ a $5,0 \times 10^5$ UFC g⁻¹.

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

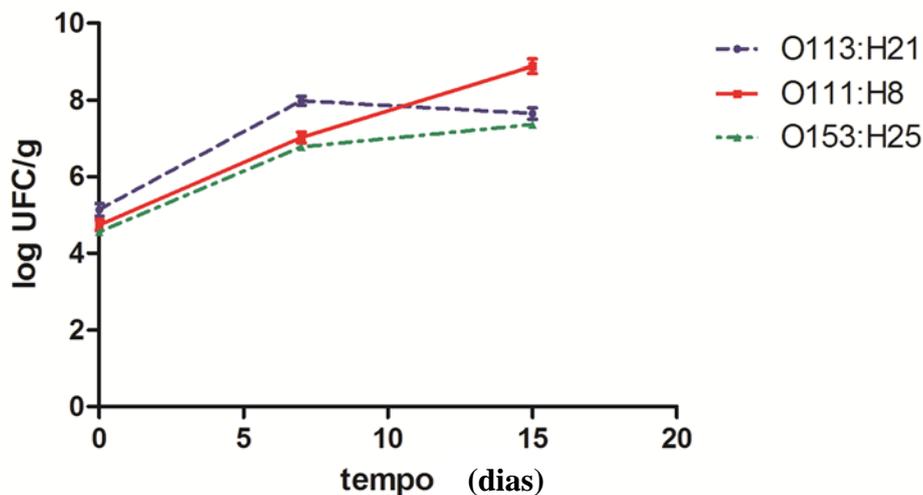


Figura 1 - Contagens de STEC não O157 em queijo minas frescal, preparado após inoculação de 10^3 UFC ml^{-1} dos microorganismos em leite.

Já os leites inoculados 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 psicotróficos 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 psicotróficos totais, respectivamente (Figura 2).

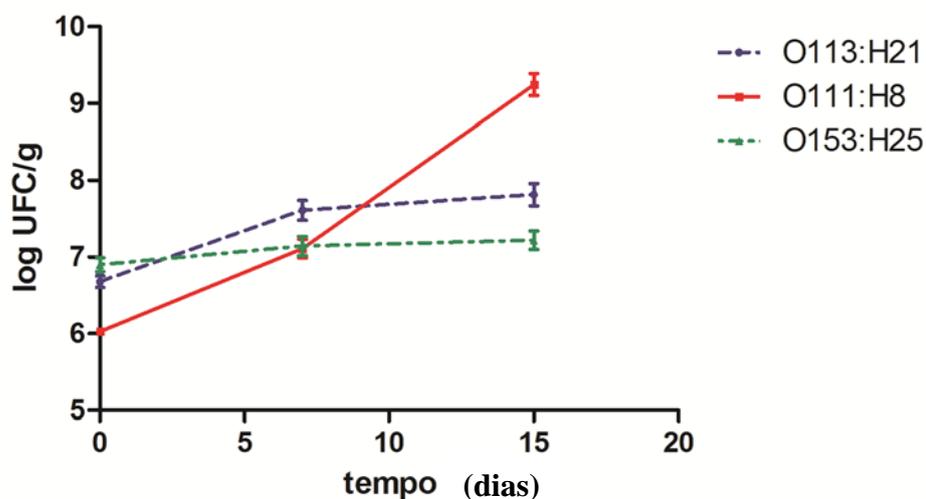


Figura 2 - Contagens de STEC não O157 em queijo minas frescal, preparado após inoculação de 10^5 UFC ml^{-1} dos microorganismos em leite.

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 psicotróficos 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} psicotróficos 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 psicotróficos 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 psicotróficos, 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 psicotróficos 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 e $3,6 \times 10^{10}$ UFC g^{-1} para psicotróficos 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 psicotróficos 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 psicotróficos 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° e 42°C) favorecem a atividade microbiana durante o tempo de processamento. Durante o tempo de armazenamento, houve aumento da produção microbiana mesmo a 8°C, temperatura máxima recomendada pela legislação brasileira (BRASIL, 1997), portanto a temperatura de 8°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 microrganismo 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 microrganismos e a temperatura máxima de refrigeração 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.

Acesso em: 05abr. 2014.

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>. 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-0157 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 0157: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>. 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, p159-164, 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&keytype2=tf_ipsecsha>. Acesso em: 02 out. 2011.

3.2 ARTIGO 2. Formação de biofilmes de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) produtoras de toxina shiga em superfície de aço inoxidável utilizada na indústria de alimentos e a eficácia de sanitizante.

Biofilm formation of *Escherichia coli* shiga toxin-producing O153: H25, O113: H21 and O111: H8 (STEC non-O157) in stainless steel surface used in the food industry and the effectiveness of sanitizer.

Paulo Gomes de Lima^I, Julia do Prado Lima Guimarães Cabral^{II}, Luciana Maria Ramires Esper^{II}, Alice Gonçalves Martins Gonzalez^{II}, Robson Maia Franco^I

^I Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil. E-mail: pglima@id.uff.br

^{II} Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, UFF, Niterói, RJ, Brasil

Resumo

Nesse estudo objetivou-se inicialmente, a avaliação da formação de biofilmes de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) produtoras de toxina shiga em superfície de aço inoxidável, superfície esta, amplamente utilizada na indústria de alimentos e a eficácia de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na inativação desses biofilmes. Demonstrou-se a capacidade de formação de biofilme por todas as cepas de *E. coli* produtoras de toxina shiga, dados estes, escassos na literatura científica. Na avaliação da eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio, observou-se a redução a $>1 \log \text{ UFC/cm}^2$ em todas as cepas e tempos avaliados, reforçando a importância do correto procedimento de higienização. Os dados apresentados referem-se a cepas isoladas de rebanhos do país, capazes de formar biofilmes podendo tornar-se importantes fontes de contaminação no ambiente de produção de alimentos, reforçando o risco à saúde pública. Estes dados fomentam uma lacuna na literatura científica.

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

Abstract

This study aimed the evaluation of biofilm formation of *Escherichia coli* O153: H25, O113: H21 and O111: H8 (STEC non-O157) shiga toxin-producing in stainless steel surface, widely used in industry food and the efficacy of inactivation of these biofilms from different concentrations of sodium hypochlorite. It was demonstrated ability to form biofilm for all *E. coli* producing Shiga toxin strains. In assessing the effectiveness of sodium hypochlorite sanitizer was observed to reduce to $> 1 \log$ CFU / cm² in all strains and times evaluated, reinforcing the importance of the correct procedure of cleaning, observing all factors that may affect the action of sanitizers. The data presented in this study are important to warn about the ability of *E. coli* non-O157 shiga toxin producing strains to form biofilms, which were isolated from herds in the country and present risk to public health, and at this moment that are few reports in the literature and government agencies,

Key words: (STEC non-O157), Biofilms, shiga toxin-producing, stainless steel

Introdução

As *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) causam, em humanos, colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica-urêmica (SHU) e diarreia sanguinolenta. Surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157:H7, O157:H-, O26:H11, O111:H8, O111:H-, O103:H2, O113:H21 e O145:H- (CAPRIOLI et al., 1997 ; ETHELBERG et al., 2009 ; JOHNSON et al., 1996 ; PATON & PATON, 1998). Animais domésticos e selvagens, principalmente ruminantes como bovinos, ovinos e caprinos são considerados os principais reservatórios de STEC (BEUTIN et al., 1993). A maioria dos estudos sobre a ocorrência de STEC em alimentos relaciona-se com surtos alimentares. Tem-se observado que vários sorotipos de STEC tem a capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em grande variedades de superfície de contato , de material usados nas plantas de processamento de alimentos (WANG et al, 2012). Biofilmes formados por microrganismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto de segurança alimentar despertando o interesse de inúmeros grupos de pesquisas (ZOTOLLA & SASAHARA, 1994; GANDARA & OLIVEIRA, 2000; SHARMA & ANAND, 2002; SHI & ZHU, 2009). Segundo FARROCK et al. (2013), poucos trabalhos tem sido realizados no desenvolvimento de biofilmes de STEC dentro do contexto de produtos lácteos, embora como outras bactérias, a *E.coli* O157:H7 sabe-se que é capaz de aderir e formar biofilmes em superfícies que são comumente utilizadas em ambientes de processamento de alimentos como aço inoxidável. Portanto, os dados apresentados neste trabalho são de importância para alertar sobre a capacidade de cepas de *E.coli* produtoras de toxina shiga não-O157 formarem biofilmes em superfícies que são comumente utilizadas na indústria de alimentos e servirem como fonte de contaminação cruzada e causar casos e surtos

de doenças veiculadas por alimentos. Nesse âmbito, realizou-se também a avaliação da eficiência de sanitizantes de uso industrial na remoção de biofilmes formados, visando a inocuidade alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras bacterianas e condições de cultivo

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 por observação microscópica dos aspectos morfológicos e tintoriais em lâminas com esfregaço corados pelo método de Gram, testes bioquímicos (ZADIK et al., 1993) e moleculares (GONZALEZ, 2003).

Formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável

A capacidade de formação de biofilme foi testada em cupons de aço inoxidável AISI 304 com acabamento número 4 (#4). O material com estas especificações é o mais utilizado pela indústria de alimentos na construção de equipamentos, bancadas e utensílios em geral. Foram utilizados cupons com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm (ESPER, 2010).

A remoção e determinação do número de células sésseis foram realizadas conforme PARIZZI et al. (2004), com modificações. As amostras foram incubadas a temperatura de 25 °C e avaliadas quanto a formação de biofilme nos tempos 6, 12 e 24 horas.

Os cupons de aço inoxidável foram retirados do meio de cultivo *Trypticase Soy Broth* (TSB) com o auxílio de uma pinça estéril e foram imersos em 10 mL de *Phosphate Buffer Salt* (PBS), por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de PBS e agitados em vortex, durante 2 minutos para remoção de células sésseis. Diluições adequadas foram transferidas pelo método de plaqueamento em superfície para placas de Petri contendo TSA (Difco[□]) e incubadas a 35 ± 1 °C por 24 horas, determinando-se desta forma, o número de UFC/cm² aderidas a cada cupom (ESPER, 2010).

Eficácia de sanitizante na remoção de biofilmes em superfície de aço inoxidável

A eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio nas diferentes concentrações 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹ foi avaliada conforme metodologia descrita por PARIZZI et al. (2004), modificado. Para cada experimento os sanitizantes foram preparados com no máximo 15 minutos de antecedência ao uso e diluídos em água destilada esterilizada, até obtenção da concentração recomendada pelo fabricante.

Diluições apropriadas foram preparadas e transferidas para placas de Petri contendo meio TSA (Difco[□]) pelo método de plaqueamento em superfície e incubadas a 35 ± 1 °C por 24 horas (PARIZZI et al. 2004, modificado). Simultaneamente foi realizada a contagem de UFC/cm² dos cupons controles, que não receberam os sanitizantes, com o intuito de avaliar o efeito destes sobre os biofilmes formados.

Foram realizados três experimentos independentes, tanto para a formação de biofilmes microbianos quanto na eficácia dos sanitizantes, em duplicata, tendo sido o tratamento estatístico dos resultados obtido pela análise de variância (ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para comparação entre as médias foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Para tal, foi utilizado o programa Graph Pad Prism[□], versão 5.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução do número de células sésseis aderidas à superfície de aço inoxidável após remoção das células planctônicas, caracterizando a formação de biofilmes dos isolados de *E. coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) é apresentada na **Figura 1**.

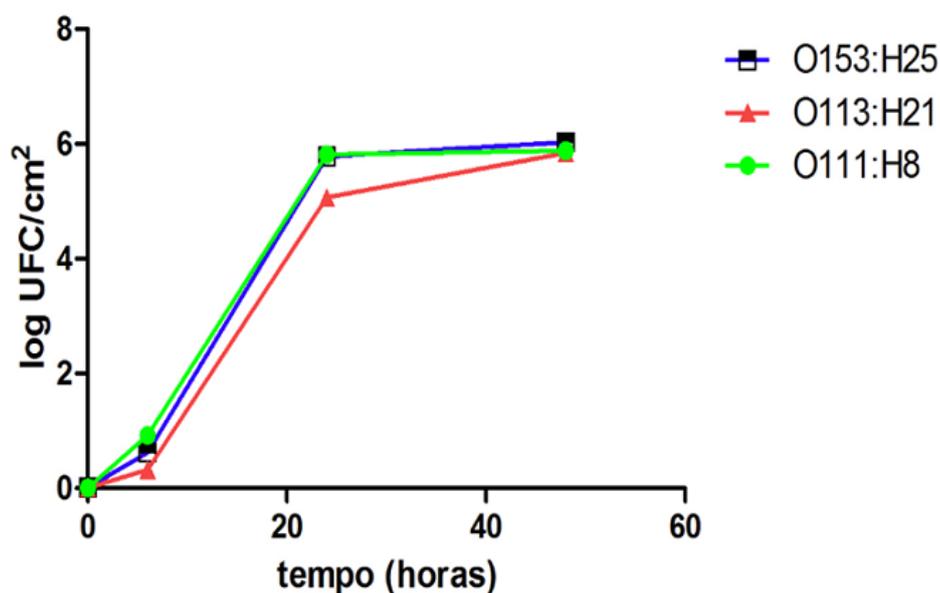


Figura 1. Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de isolados de *E. coli* STEC não-O157 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata.

As maiores contagens de células sésseis de *E. coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) nos cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, foram encontradas

após 48 horas, com valores médios de 6,04 log UFC/cm², 5,86 log UFC/cm² e 5,90 log UFC/cm², respectivamente caracterizando a formação de biofilmes microbianos, pois as contagens referem-se à células sésseis que ficaram aderidas à superfície, mesmo após a retirada das células planctônicas.

Houve diferença significativa entre todos os tempos de formação de biofilmes das *E. coli* estudadas (6, 24 e 48 horas). Na análise entre as cepas amostradas, constatou-se diferença significativa entre os mesmos tempos das diferentes cepas, com exceção do tempo de 24 horas quando comparou-se *E.coli* O153:H25 e *E.coli* O111:H8 e no tempo de 48 horas quando comparou-se *E.coli* O113:H21 e *E.coli* O111:H8. Analisando os diferentes tempos, na maior parte foi encontrada diferença significativa, com exceção da *E.coli* O113:H21 (contagem de 48 horas) comparada à *E.coli* O111:H8 no tempo de 24 horas.

Os dados resultantes deste trabalho são de grande importância, pois há carência de informações na literatura científica sobre a formação de biofilmes microbianos em *E.coli* produtoras de toxina shiga, principalmente de cepas STEC não-O157. Estudos sobre a formação de biofilmes em STEC são principalmente relatados ao sorotipo O157:H7 e há poucos dados relacionados à formação de biofilmes em outros sorotipos (BISCOLA et al. 2011; FARROKH et al, 2013). Este fato é preocupante, pois há diferenças comprovadas entre diferentes gêneros, espécies e sorotipos de microrganismos. A ausência de conhecimento do comportamento destes microrganismos, em aderir e formar biofilmes nas diferentes superfícies do processamento de alimentos, são imprescindíveis para a inocuidade de alimentos e adequação dos processos de higienização para prevenir contaminações cruzadas.

Na literatura até o momento, há dois principais trabalhos. Rivas et al, 2007, avaliaram a capacidade de formação de biofilmes por dez diferentes cepas de *E.coli*, sendo sete de STEC (O157:H7, O157:H4, O91:H21 e O174:H21) e três de não - STEC (não toxigênico O157:HR, O13rel:H4 e O1:H7), por duas metodologias, a avaliação por microplacas de poliestireno e superfícies de aço inoxidável e demonstraram que cada cepa tem habilidade diferente de formação de biofilme em cada superfície e que todas as cepas possuíam a capacidade de se aderir em superfície de aço inoxidável, fato este que não ocorreu na metodologia de microplacas. Os autores sugeriram que a produção de biofilmes em microplaca de poliestireno pode não ser apropriada para representar outras superfícies e que deve-se ter atenção ao escolher o método de quantificação de biofilme em superfícies. Os mesmos autores reforçaram a necessidade da pesquisa da capacidade de formação de biofilmes por cepas de interesse, como as utilizadas neste trabalho, isoladas de bovinos do Estado do Rio de Janeiro, por terem comportamentos diferentes, além do fato de utilizar-se como corpo de prova, o aço inoxidável AISI 304 #4, que mimetiza a superfície dos equipamentos na produção de alimentos.

A formação de biofilmes por *E.coli* STEC é associada à expressão de diferentes adesinas como, por exemplo, fimbria tipo1, curli, Ag43, Cah e EhaA. BISCOLA et al. (2011) ao estudarem a formação de biofilmes verificaram a presença de genes relacionados a diferentes adesinas, em 18 cepas de O157 e 33 cepas não-O157, observaram a formação em 5/18 (28%) cepas de O157 STEC e 17/33 (51%) de não O157 a temperatura de 28 °C por 48 h. A pesquisa de genes é importante, porém estes podem não ser expressos, dependendo das condições ambientais, por este motivo avaliação da formação de biofilmes em aço é essencial para demonstrar a característica fenotípica.

Segundo MEYER (2003), existe três estratégias para se tentar solucionar os problemas dos biofilmes: i) sanitização antes da sua formação, ii) sanitização após sua formação, ou iii) utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos. Neste sentido, foi testado o sanitizante mais comumente utilizado nas superfícies do processamento de alimentos, o hipoclorito de sódio em duas concentrações usualmente utilizadas, 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹ (SANTOS, 2007), por ser eficiente e de baixo custo. No presente estudo, as contagens iniciais de células sésseis das cepas de *E. coli* foram reduzidas aos níveis inferiores a 1 log UFC/cm² após sanitização com hipoclorito de sódio 100mg.L⁻¹ e 200mg.L⁻¹, conforme observa-se nas tabelas 1, 2 e 3 e figuras 2, 3 e 4. Estes dados são importantes, pois observa-se que se utilizados de forma correta, o agente sanitizante para estas cepas, são eficazes, considerando-se a importância da correta elaboração e implantação do programa de higienização de processamento da matéria prima e na planta de processamento de Queijo Minas Frescal. Ressalta-se a importância da observação dos critérios de utilização deste produto, pois o hipoclorito de sódio possui baixa estabilidade e sofre influencia da luz, temperatura e pH, afetando sua eficiência.

No levantamento bibliográfico para realização desta pesquisa não foram encontrados trabalhos sobre a suscetibilidade de cepas de *E.coli* STEC não-O157 produtoras de toxina shiga a sanitizantes, o que reforça a necessidade de maior pesquisa nesta área, considerando que surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157:H7, O157:H-, O26:H11, O111:H8, O111:H-, O103:H2, O113:H21 e O145:H- conforme relatos de Caprioli et al. 1997; Ethelberg et al. 2009; Johnson et al. 1996; Paton & Paton, 1998.

Tabela 1. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O153:H25 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Tempo	Contagem Inicial (log UFC/cm ^{2*})	Contagem Final (log UFC/cm ^{2*})	
		Hipoclorito de sódio (100mg.L ⁻¹)	Hipoclorito de sódio (200mg. L ⁻¹)
6 horas	0,6	<1	<1
12 horas	5,77	<1	<1
24 horas	6,02	<1	<1

*Média de três repetições em duplicata.

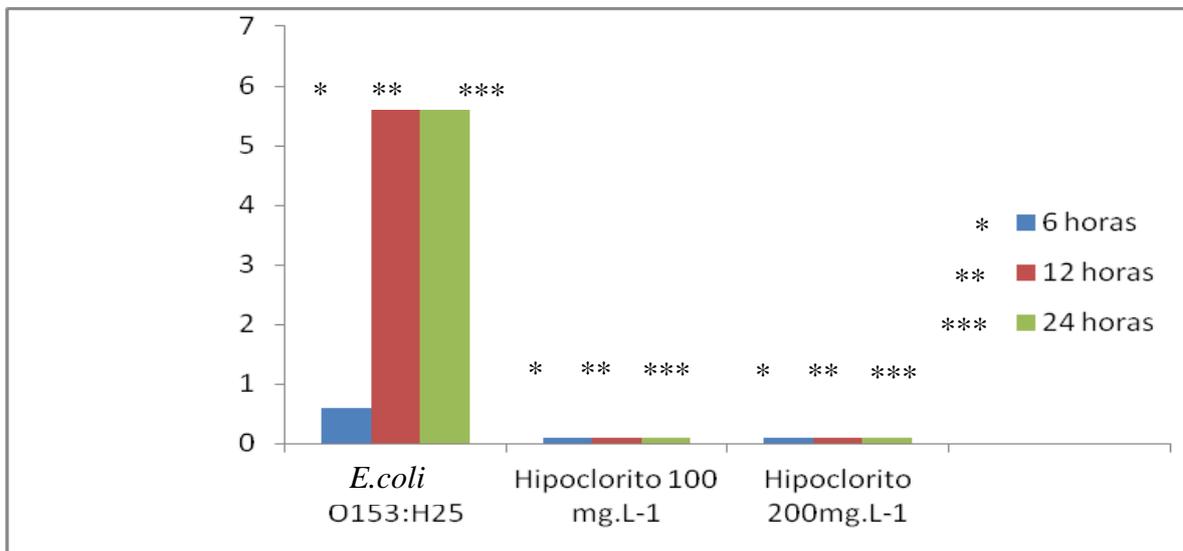


Figura 2. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O153:H25 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Tabela 2. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O113:H21 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Tempo	Contagem Inicial (log UFC/cm ²)	Contagem Final (log UFC/cm ²)	
		Hipoclorito de sódio (100mg.L ⁻¹)	Hipoclorito de sódio (200mg.L ⁻¹)
6 horas	0,3	<1	<1
12 horas	5,06	<1	<1
24 horas	5,83	<1	<1

*Média de três repetições em duplicata.

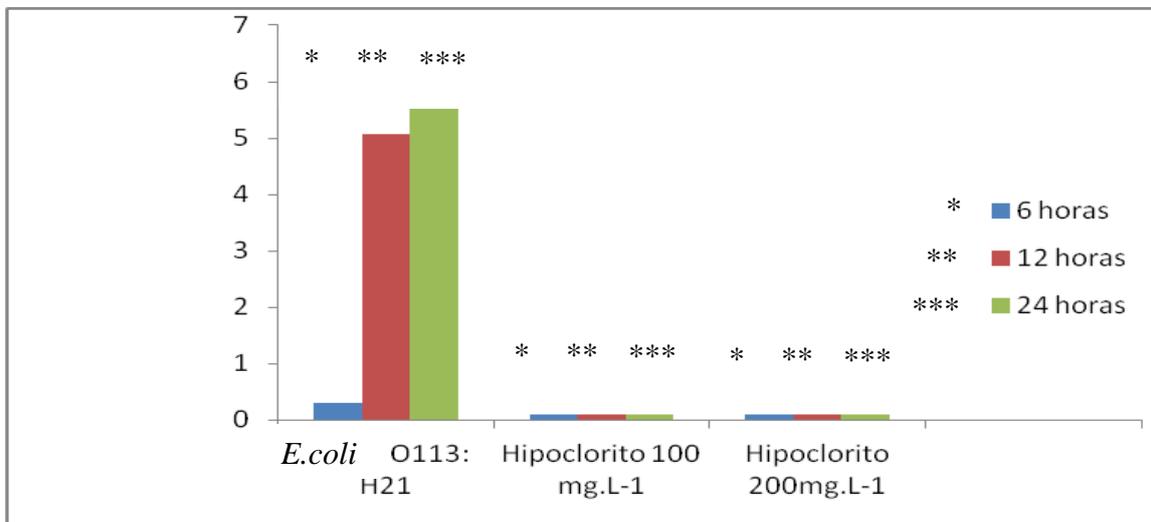


Figura 3. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O113:H21 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Tabela 3. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O111:H8 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Tempo	Contagem Inicial (log UFC/cm ²)	Contagem Final (log UFC/cm ²)	
		Hipoclorito de sódio (100mg.L ⁻¹)	Hipoclorito de sódio (200mg. L ⁻¹)
6 horas	0,9	<1	<1
12 horas	5,81	<1	<1
24 horas	5,87	<1	<1

*Média de três repetições em duplicata.

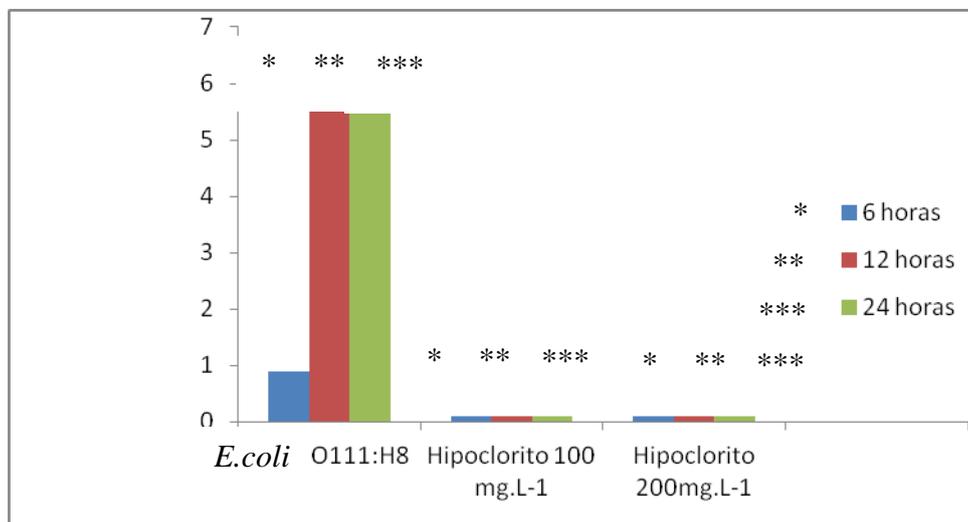


Figura 4. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* O111:H8 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Conclusão

Os dados oriundos de cepas isoladas de rebanhos do país, apresentados neste trabalho, são de extrema importância para alertar sobre a capacidade de cepas de *E.coli* produtoras de toxina shiga não-O157 de formar biofilmes microbianos, o que irá preencher uma importante lacuna na literatura científica, servindo de alerta para que os programas de sanitização sejam preventivos. Sabe-se que a formação de biofilmes microbianos são importantes fontes de contaminação, acarretando em risco à saúde coletiva, logo conclui-se também que a correta utilização de hipoclorito de sódio nas concentrações utilizadas neste estudo, é eficiente para reduzir a contagem de células sésseis dos biofilmes, ressaltando a importância do correto programa de higienização na inocuidade dos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEURTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of health domestical animals. *J. Clin. Microbiol.* 31:2483-2488, 1993.
- BISCOLA, F. T.; ABE, C. M. and GUTH, B. E. C. Determination of Adhesin Gene sequences in, and Biofilm Formation O157 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2201-2208, 2011.
- CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.*, 36: 289-311, 2005.

ESPER, L. M. R. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*: Quorum Sensing, Formação de Biofilme e Ação de Sanitizantes. 2010. 125 p. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo., 2010.

ETHELBERG, S.; SMITH, B.; TORPDAHL, M.; LISBY, M.; BOEL, J.; JENSEN, T.; NIELSEN, E.M.; MELBAK, K., 2009. Outbreak of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection from consumption of Beef Sausage. CID 48:78-81.

FARROCKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; REU DE, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRICKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. International Journal of Food Microbiology, 162: 190-212, 2013.

GANDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. Ciência Tecnologia Alimentos, Campinas, v. 20, n. 1, 2000.

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. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, IMPPG-UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

JOHNSON, R.P.; CLARKER, R.C.; WILSON, J.B.; READ, S.C.; RAHN, K.; RENWICK, S.C.A.; SANDHU, K.A.; ALVEAS, D.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; MCEWEN, S.A.; SPIKA, J.S. GYLES, C. L. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* p.59, v. 1112-1122, 1996.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration Biodegradation*, Barking, v.51, p.249-253, 2003.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A.M. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, p. 77-83, 2004.

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. *J. Clin. Microbiol.*36: 598-602, 1998.

RIVAS, L.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods* 69:44-51, 2007.

SANTOS, M. V. Boas Práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite in: *O Brasil e a nova era do mercado do leite – compreender para competir*. Piracicaba-SP: Agripoint Ltda, 2007, v. 1, p. 135-154, 2007.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, v.13, p.469-477, 2002.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054, 2009.

WANG, R.; BONO, J. L.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. HARHAY, D. M. Biofilm Formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Strain And Their Tolerance to Sanitizers commonly used in the Food Processing Environment. *Journal of Food Protection*, vol. 75, N° 8, 1418-1428, 2012.

ZADIK P.M.; CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology*, v.39, p.155-158, 1993.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, p. 125-148, 1994.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se com este trabalho que, se a matéria prima utilizada na elaboração do QMF, for contaminada com STEC não-O157 usada neste estudo, a temperatura utilizada no processamento e a temperatura máxima recomendada pela legislação para conservação do produto, não são suficientes para inibir ou eliminar o crescimento bacteriano, mantendo o risco ao consumidor e ao ambiente.

É imprescindível a atenção à qualidade da matéria prima, das ferramentas de qualidade dos procedimentos zootécnicos e da indústria, para garantir a inocuidade do produto final.

As cepas utilizadas neste estudo, *E. coli* O153:H25; O113:H21 e O111:H8 são capazes de crescer e formar biofilme na superfície de aço inox, amplamente utilizados na indústria de laticínios e são susceptíveis, à concentração de hipoclorito de sódio, comumente utilizados nos programas de higienização.

Sendo de vital importância, o correto procedimento de higienização das superfícies de contato com o alimento, considerando-se todos os fatores que podem afetar a ação e eficácia do sanitizante utilizado, para evitar o desenvolvimento de biofilmes assim como a eliminação, e também impedir a possível contaminação cruzada no produto processado, pondo em risco a segurança alimentar e conseqüentemente a saúde da população.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. *Food Microbiology*. 3 ed. Cambridge: Royal Society Chemistry, 477 p. 2008.

ANDRADE, N.J.; BRIDEGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*, v. 61, p.833-838, 1998.

_____.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. *Adesão e formação de biofilmes microbianos*. In: ANDRADE, N. J. Higiene na Indústria de Alimentos - Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo (SP): Varela. 410p, 2008.

_____.; _____.; ROSADO, M. S. *Controle da higienização na indústria de alimentos*. In: ANDRADE, N. J. Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. SãoPaulo(SP): Varela. 410p, 2008.

ANDREATTA, E. *Avaliação da Qualidade dos Queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas*. 2006. Tese (Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

_____.; FERNANDES, A.M.; SANTOS, M.V.D.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M.C.; GIGANTE, M.L.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Qualidade do queijo minas frescal preparado com leite com diferentes qualidades de células somáticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, n. 44, v.3, p.320-26, 2009.

ARAUJO, W.N.; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVEIRA, V.F.; BANAS, S.L.B.; SILVA, A.V.A.F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo minas comercializado na região metropolitana de Salvador, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, n.2, p. 37-42, 2001a.

_____.; _____.; _____.; _____.; _____. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, n. 1, p.10-14, 2001b.

_____. V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.; FREITAS-ALMEIDA; A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese comercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, n. 92, p.1172-77, 2002.

ARCURI, E. F. et al. *Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 3, p.440-6, 2006

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJOS(ABIQ) Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. 2011 Disponível em http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17. Acessado em 02 de ago de 2014.

BAGI, L.K.; BUCHANAN, R.L. Preservation of *Listeria monocytogenes* and other pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Letter Applied Microbiology*, n.17, p.37-9, 1993.

BASTIAN, S.N.; CARLE, I.; GRIMONT, F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, n.149, p.457-72, 1998.

BERGANIMI, A., M., M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B., E., C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, n. 38, p.553-6, 2007.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. *Ciências Biológicas e da Saúde*, n. 2, v.28, p.81-92, 2007.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEURTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of health domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, n.31, p. 2483-88, 1993.

_____.; MIKO A.; KRAUSE G.; PRIES K.; HABY S.; STEEGE K.; ALBRECHT N. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, n.73, v.15, p.4769-75. Epub 2007 Jun 8. 2007.

BHUNIA, A. K. *Foodborne Microbial Pathogens: mechanisms and pathogenesis*. New York: Springer, 290 p.,2008.

BISCOLA, F. T.; ABE, C. M. and GUTH, B. E. C. Determination of Adhesin Gene sequences in, and Biofilm Formation O157 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Applied Environmental Microbiology*, n. 77, p. 2201-8, 2011.

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*, n. 37, p. 497-503, 1999.

BONARDI, S.; CHIAPPONI, C.; BACCI, C.; PARIS, A.; SALSU, A. Non-O157 verocytotoxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle at slaughter in Northern Italy. *Anais da Faculdade de Medicina Veterinária*, v. 25, p. 181- 90, 2005.

BONNET, R.; SOUWEINE, B.; GAUTHIER, G.; RICH, C.; LIVRELLI, V.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Non-O157 *Stx2*-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 36, p.1777–80, 1998.

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.2103-12, 2011.

BRANT, L,M,F; FONSECA, L,M; SILVA, M,C,C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 59, v.6, p.1570-74, 2007.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Queijos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo a, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, de 30 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 6.

_____. 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/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1220>>. Acesso em: 05 nov. 2013.

_____. 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/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 05 nov. 2013.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001. *Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos*.

_____. RDC nº 275, de 21 de Outubro de 2002. *Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos*, 2002.

BRASIL. Ministério da saúde. *Guia Alimentar para a População Brasileira*. Secretaria de Atenção à Saúde, Brasília, 2005.

BRETT, K.N.; HORNITZKY, M.M.; BETTELHEINN, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2-EDL933* and/or *stx2vhb* subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, n.41, p. 2716-22, 2003.

BROOKS, J.T.; SOWERS, E.G.; WELLS, J.G.; GREENE, K.D.; GRIFFIN, P.M.; HOEKSTRA, R.M.; STROCKBINE, N.A. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983 – 2002. *Journal of Infectious Diseases*, n.192, p.1422-29, 2005.

BROWN-BRANDL, T.M.; BERRY, E.D.; WELLS, J.E.; ARTHUR, T.M.; NIENABER, J.A. Impacts of individual animal response to heat and handling stresses on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding by feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, n. 6, v.7, p.855-64, 2009.

BUCHANAN, R. L.; BAGI, L. K. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *International Journal of Food Microbiology*, n. 3-4, v. 23, p. 317-32, 1994.

_____.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Technology*, n. 51, p. 69-76, 1997.

BULHÕES, C.C.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 4, p. 54-320, 2002.

BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H. J.; BLATTNER, F. R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Research*, n.26, p. 4196-204, 1998.

BURNENS, A. P.; FREY, A.; LIOR, H.; NICOLET, J. Prevalence and Clinical Significance of Vero-cytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhea. *Journal of Veterinary Medicine*, series B n.1-10, v. 42, p. 311-18, 1995.

CALDERWOOD, S.B.; ACHESON, D.W.K.; KEUSCH, G.T.; BARRETT, T.J.; GRIFFIN, P.M.; STROCKBINE, N.A.; SWAMIMTHAN, B.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; KAPLAN, B.S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A.D.; OBRIG, T.G.; TAKEDA, Y.; TARR, P.I.; WACHSMUTH, I.K. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *American Society for Microbiology News*, n. 62, p.118-19, 1996.

CAMPOS HIDALGO, M.R.; KIPNIS, A.; BORGES PORFÍRIO, M.C.D.; VIEIRA, C.A.; BORGES, L.; SANTOS, P.; SERAFIN, A. Phenotypic characterization by antibiogram of *Escherichia coli* strains isolated from handlers, raw milk and "Minas Frescal" cheese samples in a dairy process plant in Goiás, Brazil, *Ciência Rural*, n.4, v. 36, p.1221-27, 2006.

CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T.; CAUDURO, PF; DIAS CAG, MAZZARI, A.; BRODT, T. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O9:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*, n. 31, p.266-70, 2000.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, n.36, p. 289-311, 2005.

_____, TOZZI, A.E., RIZZONI, G., KARCH, H. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, n. 3, p, 578-79, 1997.

CARVALHO, J.D.G. *Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP. Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2003.

CASTANIE-CORNET, M. P.T. A.; PENFOUND, D.; SMITH, J. F.; ELLIOTT, AND J. W. FOSTER. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, n.181, p. 3525–3535, 1999.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, n.79, p.483-499, 2008.

CDSC. *Escherichia coli* O157:H7 infection and unpasteurized cream in England. *Communicable Disease Surveillance Centre*. Commun. Eurosurveillance Wkly. n. 2, p.981-022, 1998.

CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds: *Centers for Disease Control and Prevention*. Morbidity and Mortality, Winconsin, v. 49, p. 911-13, 2000.

_____. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Disease. Disease Information. Diarrheogenic *Escherichia coli* [on line]. 2000. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/diarrecoli-t.html>>. Acesso em 15 jan. 2011.

CERQUEIRA, A.M.F., TIBANA, A.; GUTH, B.E.C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from raw beef product in Rio de Janeiro City, Brazil. *Journal of Food Protection*, n. 60, p.177-80,1997.

_____.; 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*, n. 70, p. 111-21, 1999.

CHIUEH, L.F.; LIU, F.; SHIH, D.Y. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feed and raw milk of domestic cattle and sheep. *Journal of Food and Drug Analysis*, n. 10, p.39-46. 2002.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Institute of Food Technologists*, v.2, p.22-32, 2003.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, n. 21 v. 2, p. 535-41, 2004.

CHOO, J.H.; RUKAYADI, Y.; HWANG, K. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*. v. 42, p. 637-41, 2006.

CORDOVEZ, A., PRADO, V., MAGGI, L., CORDERO, J., MARTINEZ, J., MISRAJI, A., RIOS, R., SOZA, G., OZEDA, A., LEVINE, M.M., 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic uremic syndrome in Chilean children. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 30, p. 2153-57, 1992.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. In: APHA (American Public Health Association). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4.ed. Washington, 2001. 676 p. c.13, p.159-66, 2001.

DOYLE, M. ; PADHYE, V. *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. (Editor), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p. 236-82, 1989.

_____; P.; BEUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, T. J. *E. coli* O157:H7. In: DOYLE, M., P. et al. (Eds) *Food Microbiology – Fundamentals and frontiers*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 799p. p.171-79, 1997.

_____. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, n. 12, p. 289-302, 1991.

DYTOC, M. T.; ISMAILI, A.; PHILPOTT, D. J.; SONI, R.; BRUNTON, J. L.; SHERMAN, P. M. Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infection and Immunity*, n.62, p. 3494-505, 1994.

ECHEVERRY, A. *Survival and distribution of Escherichia coli* O157 in bovine manure. Texas, 2004. 182f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia) – Pós-graduação da Texas Tech University, Texas Tech University, Texas, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Estatística do leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php>. Acessado em 02 de ago de 2014

ESPER, L. M. R. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*: *Quorum Sensing, Formação de Biofilme e Ação de Sanitizantes*. 2010. 125 f. Tese

(Doutorado em tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo., 2010.

ETHELBERG, S.; SMITH, B.; TORPDAHL, M.; LISBY, M.; BOEL, J.; JENSEN, T.; NIELSEN, E.M.; MELBAK, K. Outbreak of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection from consumption of Beef Sausage. *Center for Infectious Diseases*, n. 48, p.78-81, 2009.

FAO. Top Production - Cow Milk, Whole, Fresh. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em 20 out de 2014.

FARAH, S., M.; S., S.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PIGGATO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotyping e genotyping traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, n.44, v.6, p. 607-12, 2007.

FARROCKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; REU DE, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRICKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, n.162, p. 190-12, 2013.

FLEMMING, H.C; NEU, T.R; WOZNIAK, D. J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology*, p. 7945–47, 2007.

FOLSOM, J.P; SIRAGUSA, G.R ; FRANK, J.F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, n.4, v. 69, p. 826–34, 2006.

FRANCO, R.M. *Agentes Etiológicos de Doenças Alimentares*. Editora da UFF, 120 p., 2012.

_____. *Escherichia coli: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frenal tipo toscana*. Niterói, 2002. 153 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2002.

FRANKEL, G.; PHILLIP, A. D.; ROSINSHINE, I.; DONGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, n. 30, p. 911-21, 1998.

FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D.O.; RIEMANN, H.P. *Foodborne Diseases*. 2 ed. San Diego: *Academic Press*, 2002, 379 p. cap. 5 , p. 79-100, 2002.

FREITAS, A.C.; NUNES, M.P.; MILHOMEM, A.M.; RICCIARDI, I. D. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Food Protection*., v.56, p.62-5, 1993.

FREMAUX, B.; RAYNAUD, S.; BEUTIN, L.; ROZAND, C. V. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Veterinary Microbiology*, n.117, p.180-91, 2006.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. D. M. *Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos*. São Paulo: Dipemar, p.76-77. 1994

_____. *A arte e a ciência do Queijo*. 2ª ed. São Paulo: Globo, 295p.1990.

_____. *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 200p, 2005.

GANDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos dahigienização na sua remoção. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, n. 1, v. 20, 2000.

GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F. CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 5, v.60, p.1241-49, 2008.

GEERAERD, A.H.; VALDRAMIDIS, V.P.; DEVLIEGHERE, F. BERNAERT, H.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J.F. Development of a novel approach of secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiology knowledge in black box polynomial modeling. *International Journal of Food Microbiology*, n. 91, p. 229-44, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. *Higiene Alimentar*, n.36, v. 9, p. 12-16, 1995.

GOLDWATER P. N, BETTELHEIM K. A. *The role of enterohaemorrhagic E. coli serotypes other than O157:H7 as causes of disease*. In:Karmali MA, Goglio AG (eds) Recent advances in verocytotoxin- producing *Escherichia coli* infections. (Excerpta Medica International Congress Series 1072). Amsterdam, Elsevier Science. 1994, p. 57-60, 1994.

_____.; GILES, N.; BETTELHEIM, K. A. An unusual case of microangiopathic haemolytic anaemia associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O113:H21 infection, a verocytotoxin-2/shiga toxin-2 producing serotype. *Journal of Infectious*, n. 37, p. 302-4, 1998.

GONZALEZ, A. G. M., ROSA, A. C. P., ANDRADE, J. R. C.; TIBANA A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Microbiology*, n.17, p. 321-28, 2000.

_____. *Características fenotípicas e genotípicas de cepas de Escherichia coli produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Rio de*

Janeiro. Rio de Janeiro, 2003. 184 f. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, IMPPG-UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cow's milk yogurt and ewes' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*, n. 6, p. 655-60, 2002.

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. *Epidemiologic Reviews*, n. 13, p. 60-97, 1991.

_____. *Epidemiology of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections in humans in the United States*. In KAPER, J.B. & O'BRIEN, A.D. (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. p.15-22., *American Society for Microbiology Press*, Washington D.C.. 1998.

GUDONG, W.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 62, p. 2567-70, 1996.

GUIMARÃES, C.M. *Caracterização fenotípica e molecular de amostras de Escherichia coli rfb_{O113}⁻ positivas isoladas de bovinos sadios em Miracema, RJ. Niterói, 2009.* 117 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicada. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2009.

GUNDUZ, G. T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, n.89, p. 329-36, 2006.

GUTH, B.E.C., RAMOS, S.R.T.S., CERQUEIRA, A.M.F., ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T., 2002a. Phenotypic and genotypic characteristics and epidemiologic findings of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, n.97, p. 1085-9, 2002a.

_____.; SOUZA, R. L.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil, *Emergency Infectious Disease*, v. 8: p. 535-6, 2002b.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal Animal Science*, n.85, p. E45-E62, 2007.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity island and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, n. 54, p. 641-79, 2000.

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*, n. 02, v.113, p. 199-207, 1994.

HENGGE-ARONIS, R.; FISCHER, D. Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, n. 6, p.1877–86, 1992.

HIRAMATSU, R.; MATSUMOTO, M.; SAKAE, K.; MIYAZAKI Y. Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 71, p. 6657-63, 2005.

HOFFMAN, F.L.; SILVA, J.V. DA; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica e queijos tipo “Minas frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar*, n. 96, v. 16, p. 69-76, mai. 2002.

HOHENDORFF, V. C. G.; SANTOS, D. *Produção de queijos*. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC. 50 p., 2006.

HONISH, L.; PREDY, G.; HISLOP, N.; CHUI, L.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TROTTIER, L.; KREPLIN, C.; ZAZULAK, I. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health*, n. 96, v.3, p.182-4, 2005.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. *Food Control*, v.6 p. 9–18, 1995.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal Dairy Science*, n. 88, p.450–65, 2005.

_____; BOLLIINGER, L. M. Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef cattle. *Journal of Food Protection*, n. 10, p. 2012-241, 2005.

(ICMSF), *International Commission on Microbiological Specifications for Foods Ecologia Microbiana de los Alimentos: Productos alimentícios*, v. 2, Ed. Acribia S.A. Zaragoza, 1980, p. 678-98.

IRINO, K.; KATO, M. A.; VAZ, T. M.; RAMOS, I.; SOUZA, M. A.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; GUTH, E. B. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, n. 105, p. 29-36, 2005.

_____; VAZ, T.M.I., KATO.A.M.F., NAVES, Z.V.F., LARA, R.R., MARCO, M.E.C., ROCHA, M.M.M., MOREIRA, T.P., GOMES, T.AT. ; GUTH, B.E.C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, n.8, p. 446-7, 2002.

JAIN, S; CHEN, J. Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of *Salmonella* as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. *Journal of Food Protection*, n. 11 v. 70, p.2473–9, 2007.

JENKINS, C.; PERRY, N. T.; CHEASTY, T.; SHAW, D. J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G. J.; SMITH, H. R.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 41, p. 1775-78, 2003.

JOAQUIM, R. M. *Epidemiologia de Escherichia coli produtora de toxina Shiga em bovinos: avaliação de fatores determinantes da ocorrência e estudo da dinâmica populacional*. Niterói, 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2002.

JOHNSON, R.P.; CLARKER, R.C.; WILSON, J.B.; READ, S.C.; RAHN, K.; RENWICK, S.C.A.; SANDHU, K.A.; ALVEAS, D.; KARMALI, M.A.; LIOR, H., MCEWEN, S.A.; SPIKA, J.S. GYLES, C. L. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, v.59, p. 1112-22, 1996.

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolyticuraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* stools. *Lancet*, v. 1, p. 619- 20, 1983.

_____. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, n.2, p.15-38, 1989.

KESKIMÄKI, M.; IKÄHEIMO, R.; KÄRKKÄINEN, P.; SCHEUTZ, F.; RATINER, Y.; PUOHINIEMI, R.; SIITONEN, A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 as a cause of hemolytic-uremic syndrome. *Clinical of Infectious Diseases*, n. 24, p. 1278-79, 1997.

KIM, K.Y.; FRANK, J.F. Effect of Nutrients on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, v.58, n.1, p. 24-28, 1995.

_____,H; RYU,J. H; BEUCHAT,L.R. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 4, v.73, p. 1256–65, 2007.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I. & STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, n.18, p. 775-9, 1977.

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. 676 p. c.8, p.69-82, 2001.

LAW, D., Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, n. 88, p.729-45, 2000.

LEBLANC, J. L. Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, n. 29, p.277-96, 2003.

LEOTTA, G. A.; DEZA, N.; ORIGLIA, J.; TOMA, C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKYE, E.; IYODA, S.; SOSA-ESTANI, S.; RIVAS, M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Veterinary Microbiology*, n. 118, p. 151-7, 2006.

_____.; MILIWEBSKY, E.S.; CHINEN, I.; ESPINOSA, E.M.; AZZOPARDI, K.; TENNANT, S.M.; ROBINS-BROWNE, R.M.; RIVAS, M. Characterisation of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Austrália and New Zealand. *Biomed Central Microbiology*, n. 8, p. 46, 2008.

LEVINE, M.M.; XU, J.; KAPPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, n. 156, p.175-82, 1987.

LEWIS, M.J. *Propriedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesados*. Zaragoza: Acribia, 494 p. 1993.

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>. Acesso em: 12 abr. 2014.

LINDSAY, D; BROZEL, V. S; VON HOLY, A. Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *Journal of Food Protection*, n. 5, v. 69, p. 1168–72, 2006.

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*, n. 97, p. 861-6, 2004.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciencia Rural*, n. 6, v.31, São Paulo, 2001.

LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M. & ROSA, M. F. *Epidemiology of Shiga toxin-producing Escherichia coli in South American*. In: Kaper, J. B. & O'Brien A. D. (Editors) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, DC, USA, p.30-7, 1998.

_____.; DIAZ, M., GRINSTEIN, S., DEVOTO, S., MENDILAHARZU, F., MURREY, B.E., ASKENAZI, S., RUBEGLIO, E., WALEJ, M., VASQUEZ, M., TURCO, M., PICKERING, L.; CLEARLY, T.G. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *Journal of Infectious Diseases*, n.160, p.469-75, 1989

_____.; CONTRINI, M.M. & ROSA, M.F. *Epidemiology of Shiga toxin-producing Escherichia coli in South America*. p. 30-37. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. J.B. Kaper & A.D. O'Brien (ed.). *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.1998.

LOUKIADIS, E., KEROUREDAN, M.; BEUTIN, L.; OSWALD, E.; BRUGERE, H. Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 72, p. 3245–51, 2006.

LUCK, N. S.; BENNET-WOOD, V.; POON, R.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement–negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, n. 73, p. 3063–71, 2005.

MACHADO, E.C.; FERREIRA, C. L. L.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; JUNIOR, F.N.P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 4 v. 24, p. 516-21, 2004.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 1332-44, 2005.

MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. *Avaliação das características físico-químicas do queijo Minas frescal produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas*. Pirassununga: FZEA/USP, 2004. 15 p. (Iniciação Científica).

_____, S. C.; REZENDE, J. G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.538-43, 2007.

MARTINEZ, M.S.M. ;UYTTENDAELE, M. ; RAJKOVIC, A. ; NADAL, P.; DEBEVERE, J. Degradation of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactones by *Bacillus cereus* in Culture Media and Pork Extract. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2329–32, 2007.

MAULE, A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symposium Series Society Applied Microbiology*, n. 29, p.71–78, 2000.

MAWSON, A.J. Bioconversion of whey utilization and waste abatemente. *Bioresource Technology*, v. 47, p. 195-203, 1994.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; AND TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, v. 5, p. 607-25, 1999.

MELLIES, J.L.; BARRON, A.M.S.; CARMONA, A.M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and Immunity*, v. 75 n. 9, p.4199 - 210, 2007.

MELTON, C. A.; O'BRIEN, A. D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: Kaper JB & O'Brien AD (eds). *Escherichia*

coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.121-8, 1998.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration Biodegradation*, Barking, v.51, p.249-53, 2003.

MICHELI, E. S.; PAULO, C. M. P. Microbiota intestinal de indivíduos que sofreram acidente ocupacional com materiais biológicos e que realizaram profilaxia anti retroviral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n. 40, v.6, p. 653-6, nov-dez, 2007.

MODLER, W., H. Milk Processing. *Food proteins::processing applications*. In: NAKAI, S. MODLER, H.W. (Ed.) Canada: Wiley-VCH, 88 p. 2000.

MOHAMMED, M.A.; SALLAM, K.I.; ELDALY, E.A.Z.; AHDY, A.M.; TAMURA, T. 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, p159-64, 2014.

MONAGHAN, A; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D. BOTON, D. J. Serotypes and virulotypes of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) on bovine hides and carcasses. *Food Microbiology*, n. 2, v.32, p. 223-9. 2012.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, n. 93, p. 179-83, 2003.

MORGAN, C.P.; NEWMAN, D.N.; HUTCHINSON, A.M.; WALKER, B.; F. MAJID. Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt, *Epidemiology and Infection*, n. 111, p.181-7, 1993.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 3, p. 41-51, 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, n.11, p. 142-201, 1998

NERO, L. A. ; DE MATOS, M.R.; BELOTI, V.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J.P.A.N., DE ANDRADE, N.J., SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal Microbiology*, n. 35, p. 211-5, 2004.

NISHIMURA, L.S.; SOUZA, R.L.; GUTH, B.E.C. Identificação de um caso de síndrome hemolítica urêmica relacionado à infecção por *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga O157 no Estado de São Paulo, Brasil. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos, SP. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005.

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, n. 40, p. 675-83, 1983.

OJEDA, A.; PRADO, V.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; BORCZYK, A.; JOHNSON, W.; LIOR, H.; LEVINE M. M. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 33, p. 2199-201, 1995.

OLIVEIRA, J.S. *Queijo: fundamentos tecnológicos. Ciência e Tecnologia*, 2.ed., Editora da UNICAMP, Campinas, 146 p. 1986.

_____, M. G.; BARITO, J. R.; CARVALHO, R. R.; GUTH, B. E.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; KATO, M. A.; RAMOS, I. I.; VAZ, T. M.; IRINO, K. Water buffaloes (*Buballus bubalis*) identified as na important reservoir of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. n. 18, v. 73, p. 5945 – 8, 2007.

OMBUI, J.N.; DABURIA, H. F. A.; MACHARIA, J. K.; NDUHIA, G. Coliform counts and *Escherichia coli* in raw commercial Milk from dairy farmers in Kaimbu District, Kenya. *East African Medical Journal*, n. 71, p.635-39., 1994.

ORTOLANI, M.B.T. Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. Viçosa, 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. Rapid procedure of detection enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 57, p.2693-8. 1991.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A.M. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, p. 77-83, 2004.

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*, n.36, p. 598-602, 1998a.

_____.J. C.; _____. A. W. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, n.37, p. 3362-65, 1999.

_____.A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODDROW, M.C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity*, n.69, p. 6999-7009, 2001

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

PEARCE, M. C.; JENKINS, C.; VALI, L.; SMITH, A. W.; KNIGHT, H. I.; CHEASTY, T.; SMITH, H. R.; GUNN, G. J.; WOOLHOUSE, M. E.; AMYES, S. G.; FRANKEL, G. 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 and Environmental Microbiology*, n.70, p.1708–16, 2004.

PIERARD, D., VAN ETTERIJCK, R., BREYNAERT, J., MORIAU, L., LAUWERS, S. Results of screening for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in faeces in Belgium. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, n. 9, p. 198-201, 1990.

PIGATTO, C. P.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; COMARELLA L.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; FARAH, S. M. S. S.; WARTH, J. F.; FADEL-PICHET, C. M. T. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxigen-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. *Canadian Journal of Microbiol*, n. 54, p. 588-93, 2008.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie Food Science*, v. 32, p. 321-6, 1999.

PRADO, V. J.; CORDERO, J. T.; GAREUAUD, C. M. G.; OLGUIN, H. A.; ARELLANO, C. C.; NACHAR, C. L. H.; MISRAJI, A. T.; MARTINEZ, J. D.; TOUS, M.; RIVAS, M.; LEVINE, M. M. *Escherichia coli* enterohemorrhagica en el síndrome hemolítico urémico, en niños chilenos. *Revista Médica de Chile*, n.123, p.13-22, 1995.

PRESSER, K. A., RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Modelling the growth limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 63, v.6, p. 2355–60, 1998

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCUFF, K. W.; *Clínica Veterinária – Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9 ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RAJKNOWSKI, K.T.; MARMER, B.S. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *Journal of Food Protection*, n. 58, p.1307-17, 1995.

RASMUSSEN, T.B.; SKINDERSOE, M.E.; BJARNSHOLT, T.; PHIPPS, R.K.; CHRISTENSEN, K.B.; JENSEN, P.O.; ANDERSEN, J.B.; KOCH, B.; LARSEN, T.O.; HENTZER, M.; EBERL, L.; HOIBY, L.; GIVSKOV, M. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* .n. 151, p.1325–1340, 2005.

READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 254 ,p.1–11, 2006.

REID, T. M. S. A. Case study of cheese associated *E. coli* O157:H7 outbreaks. *Food and Nutrition*, p. 201-212, 2001.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, n. 308, p. 681–685, 1983.

RIOS, M.; PRADO, V.; TRUCKSIS, M.; ARELLANO, C.; BORIE, C.; ALEXANDRE, M.; FICA; LEVINE, M. M. Clonal Diversity of chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 37, p. 778-781, 1999.

RIVAS, M.; BALBI, L.; MILIWEBSKY, E.; GARCIA, B.; TOUS, M.; LEARDINI, N.; PRIETO, M.A.; CHILLEMI, G.M.; DE PRINCIPI, M.E. Síndrom Urémico Hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor detoxina Shiga. *Medicina (Buenos Aires)*, n. 58, p. 1-7, 1998.

_____; SOSA-ESTANI, S.; RANGEL, J.; CALETTI, M.G.; VALLÉS, P.; ROLDÁN, C.D.; BALBI, L.; MOLLAR, M.C.M.; AMOEDO, D.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; HOEKSTRA, R.M.; MEAD, P.; GRIFFIN, P.M. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, n.14, v.5, p. 763–71, 2008.

_____, L.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods*, n. 69, p. 44-51, 2007.

RIVERO, M.A.; PASSUCCI, J.A; RODRIGUEZ, E.M. AND PARMA, A. E. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina, *Medical Microbiology*, v. 59, p. 345-52, 2010.

ROBINS-BROWNER, R.M.; ELLIOTT, E.; DESMARCHELIER, P. *Shiga toxin-producing Escherichia coli* in Austrália. p.66-72. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Kaper, J.B. ; O'Brien, A.D. (ed). *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1998.

ROCHA, J.S; BURITI, F.C.A; SAAD, S.M.I. Conditions of productions and distribution of minas fresh cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n.2, v.58, p.263-72, 2006.

ROSA, V. P. Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal. Piracicaba, 2004. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 71, v.1, p. 247-54, 2005.

SALAK-JOHNSON, J.L.; MCGLONE, J.J. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *Journal Animal Science*, n. 85, p. (E Suppl):E81-E88. 2007.

SANDERS, S. Q.; FRANK, J. F.; ARNOLD, J.W. Temperature and nutrient effects on *Campylobacter jejuni* attachment on multispecies biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, n. 2, v. 71, p. 271–78, 2008.

SANGALETTI, N.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V.; ISEPON, J. S. dos; SANTOS, P. A. dos; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. *Higiene Alimentar*, n.89, v.17, p. 2003, 2007.

SANTOS, M. V. *Boas Práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite* in: O Brasil e a nova era do mercado do leite – compreender para competir. Piracicaba-SP: Agripoint Ltda, 2007, v. 1, p. 135-54, 2007.

SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, n.34, p. 2364-67, 1996.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, v.13, p.469-77, 2002.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, n. 2, v.10, p.1016, 2009

SILVA, J.A. *Tópicos da tecnologia de alimentos*. São Paulo:Varela, 231p. 2000.

_____, JÚNIOR, E. A. *Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos*. 5. ed. São Paulo: Varela, 479 p. 2002.

SIMEÃO, M.; CARVALHO, A. F.; CORREA, L. F.; STEPHANI, R.; PERRONE, I. T. *Importância da aplicação de ferramentas de qualidade e de controle de processo na produção de queijo*. Nova leite UFV, 2013. Disponível em: <http://www.m.milkpoint.com.br>. Acesso em: 20 out. 2014.

SMALL, P.; BLANKENHORN, D.; WELTY, D.; ZINSER, E.; SLONCZEWSKI, J. L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *Journal Bacteriology*, n. 176, p.1729–37, 1994.

SMITH, H.R., CHEASTY, T., ROBERTS, D., THOMAS, A., ROWE, B. Examination of retail chickens and sausages in Britain for Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 57, p. 2091-93, 1991.

SMITH, J.L.; FRATAMICOMP, M.; NOVACK, J.S. Quorum sensing: A primer for food Microbiologists. *Journal of Food Protection*, n. 5, v. 67, p. 1053-70, 2004.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, p. 428-32, 2004.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER, R.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; DANUSER, J.; BEAUTIN, L. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of Dairy Science*, n. 91, p. 2561-65, 2008.

TAMINE, A. Y.; ROBSON, R. K. *Yogurte: ciência e tecnologia*. Ed. Zaragoza, Acribia, 367 p. 1991.

TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, n. 20, p. 1-10, 1995.

TETRA PAK DAIRY INDEX. *Uma fonte semestral de notícias e de informações sobre a indústria de laticínios – Focos nos mercados emergentes*. ed. 1. Junho de 2009.

TIMM, C., D.; CONCEIÇÃO, F., R.; MENIN, A.; DA CONCEIÇÃO, R., C., S.; DELLAGOSTIN, O., A.; ALEIXO, J., A., G. Prevalence of Shiga toxin-producing in southern Brazil isolated from ground beef and raw milk. *Ciência Animal Brasileira*, n. 10, v.1, p. 641-49, 2009.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M.F., GOMES; M. J. P.; Irino, K.; Guth, B. E. C.; Andrade, J. R. C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*, n.119, p. 358-65, 2007.

TRONCO, V. M. *Manual para a inspeção da qualidade do leite*. 2ª ed. Santa Maria: UFSM, 166 p., 2003.

UHLICH, G.A.; COOKE, P. H.; SOLOMON, E. B. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of on *Escherichia coli* O157:H7 Strain and Its Role in Biofilm Formation and Resistance to Antibacterial Agents. *Applied and Environment Microbiology*, Apr. p. 2564-72, 2006.

ULRICH, R. L. *Quorum quenching*: Enzymatic disruption of *N*-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 10, v. 70, p. 6173 – 80, 2004.

VARMAN, A.H.; EVANS, M.G. *Escherichia coli*. In: _____. Foodborne pathogens: an illustrated text. *Marison Publishing*, cap. 6, 501 p. 1996.

VAZ, T.M.; IRINO, K.; KATO, M.A.; DIAS, A. M.; GOMES, T.A; MEDEIROS, M. I.; ROCHA, 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*, n. 42, p.902-5, 2004.

WALSTRA, P. et al. Principles of milk properties and processes . *Dairy Technology*. 2001.

WANG, R.; BONO; J. L.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S. HARHAY, D. M. Biofilm Formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157Strain And Their Tolerance to Sanitizers commonly used in the Food Processing Environment. *Journal of Food Protection*, n. 8, v. 75, p. 1418-28, 2012.

WATERS, C.M, BASSLER, B. Quorum sensing: cell-to-cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.21, p.319-46, 2005.

WELLS, J.G., SHIPMAN, L.D., GREENE, K.D., SOWERS, E.G., GREEN, J.H., CAMERION, 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 Shigalike-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 29, p. 985-9, 1991.

WHO. *Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC)*. Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1998.

YANO, T.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; GARCIA, M.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerro com diarreia. *Review of Microbiology*, n.17, p. 339-41, 1986.

ZADIK P.M.; CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology*, v.39, p.155-8, 1993.

ZHANG, L.H. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends in Plant Science*, n. 5, v.8, 2003.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; BESSER, R. E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 59, p.2526–30, 1993.

_____; _____. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial Mayonnaise. *Journal of Food Protection*, n. 9 p.758-44, 1994.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, p. 125-48, 1994.