

NOTA CIENTÍFICA

VIABILIDADE DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) NÃO-O157 EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL

CAROLINE PETERS PIGATTO,¹ RUBÉN PABLO SCHOCKEN-ITURRINO,² CYNTHIA MARIA TELLES FADEL-PICHETCH,³ TAMMY PRISCILA CHIODA,⁴ JULIANO VITTORI⁵ E JOSÉ MOACIR MARIN⁶

1. Doutora em Medicina Veterinária Preventiva UNESP, Jaboticabal. E-mail: carolinepigatto@yahoo.com.br (autora correspondente)
2. Professor titular da Disciplina Microbiologia Zootécnica. Departamento de Patologia Veterinária UNESP, Jaboticabal
3. Professora doutora da disciplina Bacteriologia Clínica e Biologia Molecular, Departamento de Patologia Médica, UFPR, Paraná
4. Doutoranda do Curso de Microbiologia UNESP, Jaboticabal
5. Doutorando do Curso de Microbiologia UNESP, Jaboticabal
6. Professor doutor, Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, USP, Ribeirão Preto

RESUMO

Escherichia coli, produtora de toxina Shiga (STEC), um patógeno emergente capaz de causar diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica em humanos, representa um grave problema de saúde pública em todo o mundo. O principal reservatório de STEC são os bovinos. STEC são transmitidas aos humanos, principalmente através de alimentos contaminados, destacando-se aqueles de origem bovina como carne, leite e seus derivados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de STEC não-O157 em queijo minas frescal preparado com leite artificialmente

contaminado com diferentes cepas dessas bactérias. Os queijos foram mantidos a 4°C e analisados no 1º, 2º, 4º, 6º e 10º dias de estocagem. As cepas de STEC mantiveram-se viáveis em 100% (32/32) dos queijos mantidos sob refrigeração por até dez dias. Os resultados mostram que o queijo minas pode ser veículo de transmissão de STEC. Recomenda-se a adoção de métodos higiênicos e sanitários desde a ordenha até o processo de produção do queijo para reduzir a possibilidade de contaminação com STEC.

PALAVRAS-CHAVES: PCR, queijo minas, segurança alimentar, STEC.

ABSTRACT

VIABILITY OF NON-O157 SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli* (STEC) IN MINAS FRESCAL CHEESE

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) an emergent foodborne pathogen that cause diarrhea, hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome in humans, represents a public health problem all over the world. Cattle are the main source of STEC. STEC are transmitted to humans by contaminated food, mainly those of bovine origin as meat and dairy products. This study aimed evaluates the non-O157 STEC viability of artificially inoculated in the milk used for the Minas Frescal cheese's

production. The cheese was kept at 4°C and analyzed at 1st, 2nd, 4th, 6th and 10th days after its production. 100% (32/32) of the cheese stored under refrigeration during 10 days had been the STEC strains viable. These results show that minas frescal cheese can transmit STEC. The adoption of good manufacturing practices is important from milking to the cheese production process to reduce the contamination risks by non-O157 serotypes.

KEY WORDS: Food safety, Minas cheese, PCR, STEC.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli, produtora de toxina Shiga (STEC), foi reconhecida como patógeno humano em 1983, quando RILEY et al. (1983) isolaram, de um surto de doença gastrointestinal, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU), ocorrido nos Estados Unidos, um sorotipo até então raro de *Escherichia coli* classificado como O157:H7. Desde então, mais de cem sorotipos de STEC foram reconhecidos e associados com doença em humanos, representando um problema de saúde pública em todo o mundo (BELL, 2002). As STEC são caracterizadas pela produção de toxinas Shiga do tipo 1 (Stx1) e/ou 2 (Stx2) (PATON & PATON, 1998). O principal reservatório de STEC são os bovinos e essas bactérias são veiculadas principalmente por alimentos contaminados, destacando-se carne, leite e seus derivados (NATARO & KAPER, 1998).

O interesse na segurança dos alimentos de origem animal surgiu há duas décadas, com o aumento do número de infecções em seres humanos causadas por esse patógeno (HUSSEIN & SAKUMA, 2005). As infecções causadas por STEC aumentam a preocupação em relação à produção e ao controle microbiológico de alimentos, uma vez que essa bactéria não é identificada através de técnicas microbiológicas convencionais, sendo necessário detectar a produção de toxina Shiga ou a presença dos genes *stx*.

O queijo tipo minas frescal é um produto que possui ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população brasileira. Apesar de a legislação exigir a utilização de leite pasteurizado no seu preparo, é comum a comercialização de um alimento que não atenda a essa especificação legal (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). O leite cru, matéria-prima original para a fabricação do queijo minas frescal, constitui uma importante via de transmissão de inúmeros patógenos intestinais como as estirpes de *Escherichia coli* diarrreogênicas em muitas localidades do Brasil. A ocorrência de casos de mastite no rebanho leiteiro em virtude de higiene inadequada durante a ordenha e a presença de patógenos no ambiente são as principais causas do elevado teor de bactérias

nocivas no leite e, conseqüentemente, em queijos frescos feitos sem pasteurização (GERMANO & GERMANO, 1995; LIRA et al., 2004).

O leite cru é considerado o segundo maior veículo de transmissão de diversos sorotipos de STEC (REITSMA & HENNING, 1996). Além do sorotipo O157:H7, outros, como por exemplo, O91:H21, O113:H18 e ONT:HNT, já foram detectados em leite cru e queijos (BLANCO et al., 2001; CAPRIOLI et al., 2005; HUSSEIN & SAKUMA, 2005). A presença de STEC no rebanho bovino nacional está bem documentada, e há nítido predomínio de cepas sorotipos não-O157 (IRINO et al., 2005).

Dada a importância de STEC na indústria de alimentos lácteos e a elevada frequência dessas bactérias em bovinos, no país (FARAH et al., 2007), o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de diferentes cepas de STEC em queijo minas frescal fabricado com leite artificialmente contaminado e mantido sob refrigeração a 4°C por até dez dias, simulando a fabricação industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes no leite pasteurizado

As análises para determinação de coliformes totais e termotolerantes no leite pasteurizado utilizado como matéria-prima foram realizadas seguindo a metodologia do *Compêndio de Métodos para Exames Microbiológicos de Alimentos da American Public Health Association* (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Cepas de STEC utilizadas

Dezesseis cepas de STEC não-O157, previamente isoladas de fezes de bovinos adultos aparentemente saudáveis (PIGATTO, 2004), carreando genes do tipo *stx*₂ (Tabela 1), foram utilizadas, separadamente, para contaminar alíquotas de leite usadas na produção de queijo minas frescal. As cepas de STEC foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas e colônias isoladas foram suspensas em solução

salina fisiológica esterilizada até atingir turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, o que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL. As suspensões preparadas com cada uma das cepas isoladamente foram utilizadas para contaminar alíquotas de leite distintas que foram então empregadas na fabricação de queijos. Cada amostra de leite foi contaminada com uma cepa diferente de STEC.

TABELA 1. Características genótípicas das STEC não-O157

Amostra	Genes de virulência	Subtipo
21-1	<i>stx₂</i>	<i>stx₂OX3d/O111</i>
26+4	<i>stx₂, saa</i>	<i>stx₂</i>
31+2	<i>stx₂</i>	variante
33-1	<i>stx₂, hlyA</i>	<i>stx₂/stx₂O48</i>
39+3	<i>stx₂, saa</i>	<i>stx₂</i>
43+1	<i>stx₂, hlyA, saa</i>	<i>stx₂</i>
44+1	<i>stx₂, hlyA</i>	<i>stx_{2c}</i>
46+3	<i>stx₂, hlyA, saa</i>	<i>stx₂</i>
50+1	<i>stx₂</i>	<i>stx₂vha</i>
52+1	<i>stx₂, hlyA, saa</i>	<i>stx_{2c}/vha/OX393/vhb</i>
53-2	<i>stx₂, saa</i>	<i>stx₂vha</i>
66+1	<i>stx₂</i>	<i>stx₂vhb</i>
105-2	<i>stx₂, hlyA</i>	<i>stx₂vha</i>
116+3	<i>stx₂</i>	<i>stx₂OX3b</i>
124+2	<i>stx₂</i>	<i>stx_{2c}</i>
174+1	<i>stx₂</i>	<i>stx_{2c}</i>

Fonte: PIGATTO, 2004.

Processo de produção do queijo tipo minas frescal

Para o processamento do queijo tipo minas frescal foram utilizados os seguintes produtos: leite tipo “A”, pasteurizado pelo processo HTST (*high temperature, short time*, 75°C por vinte segundos), proveniente da Granja Leiteira da FCAV, Unesp, Campus de Jaboticabal; coalho HA-LA BIOTEC[□] (Christian-Hansen) 1:20000, obtido

por fermentação, contendo 100% quimosina tipo A, CaCl₂ a 50% (Base Química) e formas plásticas estéreis.

As alíquotas de leite foram aquecidas a 35°C e adicionadas de uma das suspensões de STEC, 25mL de solução de CaCl₂ a 50% e do coalho comercial, na proporção indicada pelo fabricante. A mistura foi homogeneizada e então mantida em repouso por aproximadamente quarenta minutos até a formação do coágulo. Após esse período, retirou-se o soro presente e realizou-se a salga com NaCl diluído a 2%. Acondicionaram-se os queijos em embalagens plásticas esterilizadas, os quais foram armazenados sob refrigeração a 4°C por um período de dez dias (BRASIL, 1997). Prepararam-se os queijos em duplicata a partir de novas alíquotas de leite e suspensões de STEC.

Deteção de STEC

Para verificar a viabilidade das cepas de STEC, alíquotas de 25g de cada queijo foram coletadas após o 1º, 2º, 4º, 6º e 10º dias da fabricação e cultivadas em 225mL de água peptonada durante 24 horas a 37°C. Após esse período, 0,1mL de cada cultura foi semeado em ágar MacConkey e incubado por 24 horas a 37°C. Utilizou-se o crescimento para a extração do DNA, segundo OLSVICK & STROCKBINE (1993). Realizou-se a deteção de STEC utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo o gene *stx₂*. A reação foi desenvolvida segundo CHINA et al. (1996), utilizando os iniciadores *stx₂F* 3'TGGGTTTTTCTTCGGTATC5' e *stx₂R* 5'GACATTCTGGTTGACTCTCTT3', que amplificam um fragmento de 807pb dos genes *stx₂*. Como controle positivo e negativo foram utilizados a STEC O157:H7 EDL 933 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises microbiológicas realizadas no leite pasteurizado utilizado como matéria-prima, antes da inoculação de STEC, revelaram ausência de coliformes totais e termotolerantes. Os resultados obtidos indicam que o leite pasteurizado

utilizado como matéria-prima se enquadrando dentro dos padrões legais, considerando os padrões microbiológicos estabelecidos pelos órgãos oficiais – Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

No Brasil, o queijo tipo minas frescal é amplamente consumido pela população, em virtude, principalmente, das suas características de suavidade e baixo percentual de gordura. Esse queijo possui elevado teor de umidade, razão por que é altamente perecível. A contaminação de queijos tipo minas frescal por coliformes acima dos padrões estabelecidos foi observada em vários trabalhos (PERESI et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2005), mostrando a vulnerabilidade desse tipo de alimento à proliferação desses microrganismos. Considerando a elevada frequência de STEC em bovinos de diversas regiões do Brasil (CERQUEIRA et al., 1999; PIGATTO, 2004; IRINO et al., 2005; FARAH et al., 2007) e que essas bactérias podem entrar em contato com o leite durante a ordenha, existe a possibilidade de contaminação de queijos com essas bactérias, o que tem sido demonstrado mesmo em países com melhores padrões higiênico-sanitários (AROCHA, 1991; RAMSARAN et al., 1998; VERNOZY-ROZAND et al., 2005). Como as STEC podem causar doenças em humanos, é importante verificar se o queijo tipo minas pode ser veículo de transmissão dessas bactérias, uma vez que se trata de um tipo de queijo que é amplamente consumido no Brasil (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

As toxinas Shiga são o principal fator de virulência das STEC. A habilidade das STEC em provocar quadros graves em seres humanos depende do tipo de toxina produzida. A toxina Stx₂, codificada pelo gene *stx₂*, é mil vezes mais citotóxica para células renais do que a toxina Stx₁, codificada pelo gene *stx₁* (LOUISE et al., 1995). Mas existem diferentes subtipos de Stx₂, alguns associados com doenças mais graves, outros somente com diarreia. Cepas que contêm genes *stx_{2c}* e *stx_{2c}* são isoladas com maior frequência de casos de colite hemorrágica e SHU (EKLUND et al., 2002), ao passo que aquelas que contêm variantes como *stx_{2OX3a}* parecem ser menos patogênicas para humanos (PIERARD et al., 1998). Além disso, a

patogênese das infecções por STEC em seres humanos é multifatorial e depende de outros genes de virulência como o *ea_e* que codifica a adesina intimina, *hly_A*, que codifica a hemolisina, e *as_a*, que codifica a adesina Saa (BOERLIN et al., 1999). Neste estudo foi analisada a viabilidade, em queijo minas, de cepas de STEC não-O157 contendo diferentes genes de virulência (Tabela1).

A sobrevivência da STEC sorotipo O157:H7 em diferentes tipos de queijo foi demonstrada por AROCHA (1991) e LEUSCHNER & BOUGHTFLOWER (2002). Este é o sorotipo de STEC mais estudado, mas pouco se sabe em relação ao comportamento das STEC pertencentes a outros sorotipos.

Neste trabalho a viabilidade de STEC não O-157 em queijo minas foi avaliada apenas até o 10º dia, pelo fato de o prazo de validade do produto estabelecido pela legislação ser de dez dias. Os resultados mostraram que as diferentes cepas de STEC foram detectadas nos queijos após 1, 2, 4, 6 e 10 dias de armazenamento sob refrigeração. A viabilidade das estirpes foi confirmada através do cultivo de alíquotas de queijo em água peptonada seguido de subcultivo em ágar MacConkey, meio de onde foram retiradas as colônias para a extração de DNA e a realização de PCR. Observou-se que todas as dezesseis diferentes cepas permaneceram viáveis no queijo minas, mesmo após dez dias de conservação a 4°C. Isto confirma que cepas não-O157 são capazes de sobreviver em queijo mantido em condições adequadas de armazenamento, o que já havia sido demonstrado para o sorotipo O157:H7 e que, portanto, podem ser veiculadas aos humanos dessa forma. Os atributos associados com a virulência das cepas não parecem afetar a habilidade de as bactérias sobreviverem no queijo minas, uma vez que todas se mantiveram viáveis até o décimo dia de armazenamento a 4°C.

Muitos casos de infecção por STEC foram atribuídos ao consumo de produtos lácteos contaminados (NATARO & KAPER, 1998). Surtos e casos esporádicos de infecções causadas após o consumo de queijo contaminado com STEC foram relatados em diversos países (CURNOW, 1994; CDC, 2000). Até o momento não existem relatos de surtos causados por STEC no Brasil. Porém a

frequência elevada dessas bactérias em bovinos (CERQUEIRA et al., 1999; PIGATTO, 2004; IRINO et al., 2005; FARAH et al., 2007) indica alto potencial para a contaminação da carne, leite e do ambiente.

Considerando que as STEC não-O157 podem causar infecções graves em humanos, dada sua alta incidência no rebanho bovino e sua capacidade de se manterem viáveis em alimentos mantidos sob refrigeração, é essencial a adoção de métodos para prevenir a contaminação do leite, do queijo e de outros produtos de origem animal com essas bactérias.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que cepas de STEC não-O157 com diferentes atributos de virulência podem permanecer viáveis, por pelo menos dez dias, em queijo minas mantido sob refrigeração. Portanto, para reduzir o risco de infecções causadas por STEC em humanos, é fundamental a adoção de métodos higiênicos e sanitários que reduzam a possibilidade de contaminação do leite, incluindo cuidados durante a ordenha e no processo de elaboração de queijos e outros derivados lácteos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp), pela concessão de auxílio à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AROCHA, M. M. The behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture of cottage cheese. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 379-381, 1991.
- BELL, C. Approach to the control of entero-hemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 197-216, 2002.
- BOERLIN, P.; McEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C.L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 497-503, 1999.
- BRASIL. Portaria n°. 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova regulamento técnico para princípios gerais de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set. 1997.
- BRASIL. Resolução RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamentos técnicos sobre padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, E.; MORA, A.; ALONSO, E.; GONZÁLEZ, A.; BERNÁRDEZ, M.I. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; MCDOWELL, D. **Verocytotoxigenic Escherichia coli**. Trumbull CT: Food and Nutrition Press Inc., 2001. p.113-148.
- CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, p. 289-311, 2005.
- 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. 911-913, 2000.
- CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 111-121, 1999.
- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.
- CURNOW, J. *E. coli* O157:H7 phage type 28 infections in Grampian. **Communication Disease Environmental Health Scotland**, v. 28, p.1, 1994.
- EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEM, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4585-4593, 2002.
- FARAH, S. M. S. S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; IRINO, K.; SILVA, L. R.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.;

- PIGATTO, C.P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, Southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, doi:10.1111/j.1472-765X.2007.0, 2007.
- FERNANDEZ, T. A.; MÁRSICO, T. E.; LEAL, P. C.; SILVA, L. R. J.; BARRETO, S. L.; SILVA, A. C. O. Avaliação microbiológica e sensorial de marcas de queijo minas tipo frescal clandestino e submetido ao regime de serviço de inspeção federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 3., 2005, Búzios, Rio de Janeiro, **Anais...** 2005. CD-ROM.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.
- HUSSEIN, H.S.; SAKUMA, T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 450-465, 2005.
- IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.105, p. 29-36, 2005.
- LEUSCHNER, G. K. R.; BOUGHTFLOWER, P.M. Laboratory: scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, and dublin, **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 508-514, 2002.
- LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 861-866, 2004.
- LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.
- LOUISE, C.B.; AND, T.; O'BRIG, G. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1397-1401, 1995.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- OLSVIK, O.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like toxin genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology**. Washington: ASM, 1993. p. 271-276.
- PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.3, p.450-479, 1998.
- PERESI, J. T. M.; CARVALHO, I. S.; LIMA, S. I.; LIMA, M.; ALMEIDA, I.A.Z.C. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.
- PIÉRARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3317-3322, 1998.
- PIGATTO, C. P. **Isolamento e frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em cultura fecal de bovinos no estado do Paraná**. 2004. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, 2004.
- RAMSARAN, H.; CHEN, J.; BRUNKE, B.; HILL, A.; GRIFFITHS, M.W. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n.7, p.1810-1817, 1998.
- REITSMA, C. J.; HENNING, D.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and curing of Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 460-464, 1996.
- RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 681-685, 1983.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, Edwards Brothers, 1992. 1219 p.
- VERNOZY-ROZAND, C; MONTET, M. P.; BERARDIN, M.; BAVAI, C.; BEUTIN, L. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 235-241, 2005.

Protocolado em: 29 jun. 2007. Aceito em: 16 jun. 2008.