



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DAS CARACTERÍSTICAS DE
VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITE BOVINO
PASTEURIZADO NO ESTADO DO PARANÁ**

SIMONE APARECIDA HOFFMANN

Maringá
2013

SIMONE APARECIDA HOFFMANN

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DAS CARACTERÍSTICAS DE
VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITE BOVINO
PASTEURIZADO NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Maringá

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

H711a Hoffmann, Simone Aparecida
Avaliação da diversidade genética e das características de virulência de *Escherichia coli* isoladas de leite bovino pasteurizado no Estado do Paraná / Simone Aparecida Hoffmann. -- Maringá, 2013.
41 f. : il., figs., tab.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Jane Martha Graton Mikcha.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

1. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) - Genes de virulência. 2. Polymerase Chain Reaction (PCR). 3. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). 4. Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Polymerase Chain Reaction (REP-PCR). 5. Leite pasteurizado. I. Mikcha, Jane Martha Graton, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 21.ed. 664.07

AMMA-00943

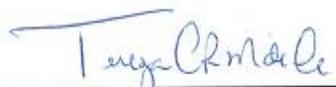
SIMONE APARECIDA HOFFMANN

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DAS CARACTERÍSTICAS DE
VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITE BOVINO
PASTEURIZADO NO ESTADO DO PARANÁ**

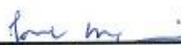
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Adriana Fiorini



Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira



Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha
(Orientadora)

Orientadora

Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha

BIOGRAFIA

Simone Aparecida Hoffmann nasceu em 21/11/1985 na cidade de Toledo. Possui graduação em nutrição pela Universidade Paranaense (UNIPAR). Tem experiência nas áreas de nutrição humana e alimentos atuando principalmente nos seguintes temas: Tecnologia de alimentos, Microbiologia dos alimentos.

DEDICO...

A minha mãe, pelo amor e carinho constante.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha pela receptividade e orientação, somados ao apoio, ensino, paciência, compreensão e pelas palavras de conforto nos momentos de angústia.

Às Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira, Dra. Adriana Fiorini pela disponibilidade e aceite para participação da banca da defesa e pelas valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Às Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis e Dra. Jacinta Sanchez Pelayo do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina por cederem os isolados de STEC.

Às professoras Dra. Rosilene F. Cardoso, Eliana V. Patussi e Dra. Adriana Fiorini, pelos ensinamentos passados, ajuda na parte experimental e pelo incentivo durante a realização desse trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, por mais essa oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

A Lúcia Harumi Ueda Cawahisa, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela amizade e gentileza de sempre nos atender quando precisamos.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia de Alimentos pela amizade construída e pelo apoio, em especial, Nancy Uchida, Michelle Piovezan, Manoel Nogueira pelos momentos de descontração e pela bela amizade construída.

A amiga Gabriela Giane Pierete, pela grande ajuda na parte experimental, pela amizade, paciência e pelos momentos de descontração nesta etapa.

Às amigas e colegas de mestrado Márcia, Cassandra, Milena, pela bela amizade construída, confiança e momentos de descontração.

À amiga Letícia Silva pela amizade construída e por muitas vezes ceder seu apartamento nas minhas vindas a Maringá.

À minha família, pelo carinho incondicional, compreensão e principalmente pelo amor demonstrado todos os dias. A minha mãe Iris, fonte maior de inspiração, pelo exemplo de vida e caráter. E minha querida irmã Sonia (in memoriam) que sempre me incentivou, e que sempre está em meu coração. Amo vocês!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E principalmente a Deus pelo dom da vida, pela saúde, proteção, pela força e presença constante que nos capacita a cada dia para alcançarmos nossos objetivos e realizar nossos sonhos. Por me direcionar nos momentos de alegria e principalmente nos momentos de aflição e tristeza. Obrigada por tudo.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico.

Simone Aparecida Hoffmann, Gabriella Giani Pieretti, Adriana Fiorini, Eliana Valéria Patussi, Rosilene Frressatti Cardoso, Jane Martha Graton Mikcha. Avaliação da diversidade genética e das características de virulência de *Escherichia coli* isoladas de leite bovino pasteurizado no estado do Paraná. Journal of Food Science.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. Although milk is a highly consumed food, its contamination and the development of pathogenic microorganisms due to its intrinsic features are rife. *Escherichia coli* not only indicates contamination from fecal sources but may also be pathogenic. Among the several pathotypes of *E. coli* that may cause diarrhea in humans, *E. coli* as a producer of Shiga toxic (STEC) causes food-transmitted diseases worldwide. Serious implications to health may occur in humans and may range from mild diarrhea to hemorrhagic colitis to severe extra-intestine complication, such as Uremic Hemolytic Syndrome (UHS) and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Virulence factors, such as Shiga toxins, intimine and enterohemolysin, are involved in STEC pathogenesis and several types of food from animal or vegetal origin cause STEC episodes. Although most food contamination episodes caused by STEC are linked to non-pasteurized milk consumption and its derivatives, episodes related to the consumption of pasteurized milk have been reported. Genotype methods such as Polymerase Chain Reaction (PCR) have been employed to study *E. coli* epidemiology and to research on virulent, fast and sensitive genes.

AIMS. Current research evaluates the genetic similarity and research genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* in *E. coli* isolated from pasteurized cattle milk.

MATERIALS AND METHODS. Eighty-seven isolates of *E. coli* from pasteurized bovine milk from 22 dairies in the northwestern region of the state of Paraná, Brazil, were analyzed. Isolates were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) with glycerol at -20 ° C, the samples were identified biochemically before extraction of DNA, which was in agreement with Swanenburg et al. (1998), with modifications. Technical enterobacterial repetitive sequence Intergenic Consensus (ERIC-PCR) and sequence repetitive extragenic palindromic (REP-PCR) were used for the genetic similarity. Values equal to or greater than 98% similarity were considered related. The discriminatory power (D) of ERIC-PCR and REP-PCR was calculated using Simpson's diversity index. For the detection of virulence genes was used PCR, primers and amplification conditions were specific to each gene *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*.

RESULTS AND DISCUSSION. ERIC-PCR and REP-PCR differentiated the isolates of *E. coli* genomic profiles 76 and 81, respectively. Analysis of ERIC-PCR and REP-PCR showed high genetic diversity among the isolates of *E. coli* could be explained by different sources of contamination by *E. coli* in bovine milk. REP-PCR mustered only bacterial isolates from the same samples of milk, ERIC PCR showed that the isolates from different samples of milk were similar. Both techniques not grouped bacterial isolates from processed milk in dairy different. Were not detected virulence genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* in isolates of *E. coli* analyzed, possibly by the low incidence of these pathogens in pasteurized dairy products.

CONCLUSION. ERIC and REP-PCR revealed a high genetic diversity of *E. coli* isolated from bovine milk pasteurized and non-detection of genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* normally present in STEC in bacterial isolates. Knowledge of the epidemiology of diarrheagenic *E. coli* in pasteurized milk is highly relevant to understanding the transmission and provides information for the development and implementation of

control measures throughout the production chain. The research on virulence factors in other pathotypes of *E. coli* is important to evaluate the potential of pasteurized commercially available as vector bacterium analyzed.

Key Words: *Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC), PCR (Polymerase Chain Reaction), virulence genes, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR), Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Polymerase Chain Reaction (REP-PCR).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. O leite é um alimento muito consumido pela população, porém devido suas características intrínsecas ele se torna propício à contaminação e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, dentre eles, destaca-se *Escherichia coli*, que além de indicar contaminação de origem fecal pode ser patogênica. Entre os diferentes patótipos de *E. coli* que podem causar diarreia em humanos, *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) é responsável por surtos de Doença Transmitida por Alimentos (DTA) em diferentes partes do mundo. Em humanos trazem sérias implicações à saúde, podendo causar desde diarreia branda à colite hemorrágica, até complicações extra-intestinais severas como Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e Púrpura Trombocitopênica Trombótica. Fatores de virulência como toxinas de Shiga, intimina e enterohemolisina estão envolvidos na patogênese de STEC. Diversos alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal, já foram incriminados em surtos de STEC. Em se tratando de leite, embora grande parte dos surtos alimentares causados por STEC estejam ligados ao consumo de leite não pasteurizado e de seus derivados, surtos relacionados ao consumo de leite pasteurizado foram relatados. Métodos genotípicos como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem sido utilizados para estudar a epidemiologia de *E. coli* bem como para a pesquisa de genes de virulência por serem rápidos e sensíveis.

OBJETIVOS. Avaliar a similaridade genética e pesquisar os genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* em *E. coli* isoladas de leite bovino pasteurizado.

MATERIAIS E MÉTODOS. Foram analisados 87 isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino pasteurizado proveniente de 22 laticínios localizados na região Noroeste do estado do Paraná. Os isolados bacterianos estavam armazenados a -20°C em Tryptic Soy Broth (TSB) com glicerol e tiveram a identificação bioquímica confirmada antes da extração do DNA, que seguiu o preconizado por Swanenburg et al. (1998) com modificações. Para o estudo de similaridade genética empregou-se as técnicas ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence*) e REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence*). Valores iguais ou maiores que 98% representaram amostras geneticamente idênticas. O poder discriminatório (D) de ERIC-PCR e REP-PCR foi calculado com base no índice de diversidade de Simpson. Para a pesquisa dos genes de virulência utilizou-se a PCR, onde os iniciadores e as condições de amplificação foram específicos para cada gene *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. ERIC-PCR e REP-PCR diferenciaram os isolados de *E. coli* em 76 e 81 perfis genômicos respectivamente. Ambos os métodos mostraram elevada diversidade genética entre os isolados bacterianos, o que pode ser justificado pelas diversas fontes de contaminação do leite bovino por *E. coli*. REP-PCR agrupou apenas isolados bacterianos provenientes de mesmas amostras de leite, enquanto por ERIC PCR, isolados de amostras de leite diferentes foram considerados idênticos. Ambas as técnicas não agruparam isolados bacterianos provenientes de leite processado em laticínios diferentes. Não foram detectados os genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* nos isolados de *E. coli* analisados, possivelmente pela baixa incidência desse patógeno em produtos lácteos pasteurizados.

CONCLUSÃO. Tanto ERIC quanto REP-PCR mostraram alta diversidade genética de *E. coli* isolada de leite bovino pasteurizado e os isolados bacterianos não apresentaram os genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, normalmente presentes em STEC. O conhecimento da epidemiologia de *E. coli* diarreio gênicas em leite pasteurizado é de fundamental importância para o entendimento da transmissão, além de dar subsídios para o desenvolvimento e a implantação de medidas de controle ao longo da cadeia produtiva. A pesquisa de fatores de virulência de outros patótipos de *E. coli* é importante para avaliar o potencial do leite pasteurizado comercialmente disponível como veículo de transmissão desta bactéria.

Palavras chaves: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC); PCR (Polymerase Chain Reaction), genes de virulência, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR), Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Polymerase Chain Reaction (REP-PCR).

ARTIGO CIENTÍFICO COMPLETO

O artigo científico que compõe esta seção foi redigido de acordo com as normas de publicação do periódico Journal of Food Science (ISSN: 1750-3841).

1 **Avaliação da diversidade genética e das características de virulência de**
2 ***Escherichia coli* isoladas de leite bovino pasteurizado no estado do**
3 **Paraná**

4
5
6 Simone Aparecida Hoffmann¹, Gabriella Giani Pieretti¹, Eliana Valéria
7 Patussi², Rosilene Fressatti Cardoso², Jane Martha Graton Mikcha²

8
9
10
11
12 1 Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias,
13 Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Bloco J-45, 87020-900, Maringá,
14 Paraná, Brasil.

15 2 Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá,
16 Avenida
17 Colombo 5790, Bloco T20, 7820-900, Maringá, Paraná, Brasil.

18
19
20 * Autor Correspondência. Jane Martha Graton Mikcha. Departamento de Análises Clínicas e
21 Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Bloco T20, 7820-
22 900, Maringá, Paraná, Brasil. Tel. +55-44-30114813; fax: +55-44-30114959

23 Endereço de E-mail: jmgmikcha@uem.br

24
25 **Versão curta do título:** Tipagem molecular e genes de virulência em *E. coli*.

26
27 Food Microbiology and Safety

28 **RESUMO:** O leite bovino é um dos alimentos mais consumidos pela
29 população, no entanto, pode transmitir microrganismos patogênicos, tais
30 como *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). O objetivo do
31 presente trabalho foi avaliar a similaridade genética e pesquisar os genes
32 *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* em *E. coli* isoladas de leite bovino pasteurizado. Foram
33 analisados 87 isolados de *E. coli* provenientes de leite bovino pasteurizado
34 em 22 laticínios localizados na região Noroeste do estado do Paraná, Brasil.
35 A similaridade genética foi avaliada empregando-se as técnicas
36 *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain*
37 *Reaction* (ERIC-PCR) e *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence*
38 *Polymerase Chain Reaction* (REP-PCR). Os isolados de *E. coli* foram
39 analisados por PCR para investigar a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae* e
40 *ehxA*. ERIC-PCR e REP-PCR diferenciaram os 87 isolados bacterianos em
41 76 e 81 perfis genômicos, respectivamente. Ambos os métodos
42 demonstraram elevada diversidade genética entre os isolados de *E. coli*. Não
43 foram detectados os genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae* e *ehxA* nos isolados
44 de *E. coli* analisados. O conhecimento da epidemiologia de *E. coli*
45 diarreiogênicas em leite pasteurizado é importante para o entendimento da
46 cadeia de transmissão e para a implantação de medidas de controle destes
47 patógenos.

48

49 **Palavras chaves:** *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), PCR
50 (*Polymerase Chain Reaction*), genes de virulência, *Enterobacterial Repetitive*
51 *Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR),

52 *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Polymerase Chain Reaction*
53 (REP-PCR)

54

55 **Aplicação prática:** Utilização das técnicas ERIC e REP-PCR no estudo de
56 diversidade genética de *E. coli*, o que possibilita uma discriminação de
57 isolados em estudos epidemiológicos. A ausência de STEC nas amostras
58 analisadas indica uma baixa prevalência dessa bactéria no leite pasteurizado
59 produzido na região estudada. Esses resultados, no entanto, não descartam
60 a necessidade de um constante monitoramento das condições de
61 processamento do leite, o que possibilita diminuição de risco a saúde dos
62 consumidores.

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77 **Introdução**

78 De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação
79 e Agricultura, a estimativa da produção mundial de leite foi de 760 milhões de
80 toneladas em 2012 (FAO 2013). Atualmente, o Brasil é o 6º maior produtor de
81 leite do mundo. Em 2011 a produção brasileira foi estimada em 31 bilhões de
82 litros e consumo em 167 litros per capita (Milk point 2012).

83 *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) é responsável por surtos
84 de doença transmitida por alimentos (DTA) em diferentes partes do mundo
85 (Farrokh e outros 2012). Diversos alimentos, tanto de origem animal quanto
86 vegetal, já foram incriminados em surtos causados por STEC (CDC 2012).
87 Grande parte dos surtos alimentares causados por STEC estavam
88 associados a leite não pasteurizado e de seus derivados, porém surtos
89 relacionados ao consumo de leite pasteurizado e derivados já foram descritos
90 (Farrokh e outros 2012).

91 A patogenicidade de STEC está relacionada, principalmente, à
92 produção de dois tipos de citotoxinas: toxinas de Shiga 1 e 2, codificadas
93 pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente; produção de intimina, responsável
94 pela adesão íntima da bactéria às células epiteliais intestinais e pela lesão
95 *attaching and effacing* (A/E), codificada pelo gene *eae* e à produção de
96 enterohemolisina (Ehly), codificada pelo gene *ehxA* (Mittelstaedt e Carvalho
97 2005). Vários estudos envolvendo a pesquisa de genes de virulência de
98 STEC em leite e derivados não pasteurizados já foram relatados no Brasil e
99 em outros países (Vicente e outros 2005; Paneto e outros 2007; Timm e

100 outros 2009; Solomakos e outros 2009; Altahi e Hassan 2009; Islam e outros
101 2010; Rahimi e outros 2011, Farzam e outros 2012; Rantsiou e outros 2012,).
102 Porém, são poucos os estudos realizados em leite e derivados pasteurizados
103 (Carneiro e outros 2006; Manna e outros 2006).

104 A contaminação do leite pasteurizado por *E. coli* pode ocorrer a partir
105 de diferentes fontes. O estudo da epidemiologia dos microrganismos,
106 especialmente a fonte de contaminação, tem sido realizado por meio de
107 técnicas moleculares como ERIC-PCR e REP-PCR (Versalovic 1991).
108 Estudos utilizando estas técnicas em *E. coli* provenientes de diferentes
109 alimentos e do ambiente têm sido relatados (Ling e outros 2000; Bhong 2006;
110 Ibenyassine e outros 2006, Wenz e outros 2006; Olivindo 2007; Rantsiou e
111 outros 2012). No entanto, de acordo com nosso conhecimento, não foram
112 encontrados estudos que utilizaram ERIC e REP-PCR para a tipagem de *E.*
113 *coli* em leite bovino pasteurizado pronto para o consumo.

114 Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a similaridade
115 genética por ERIC e REP-PCR e pesquisar os genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*
116 em *E. coli* isoladas de leite bovino pasteurizado.

117

118 **Materiais e Métodos**

119 **Isolados bacterianos**

120 Foram analisados 87 isolados de *E. coli* provenientes de leite bovino
121 pasteurizado em 22 laticínios localizados na região Noroeste do estado do
122 Paraná (Zanella e outros 2010).

123 Os isolados bacterianos que estavam armazenados a -20°C em
124 Tryptic Soy Broth (TSB- Difco, Becton Dickinson, Sparks, Md., U.S.A) com
125 glicerol no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de
126 Análises Clínicas e Biomedicina-UEM foram identificados bioquimicamente
127 antes da extração do DNA (Murray e outros 2007).

128

129 **Reação em cadeia da polimerase- PCR**

130 **Extração de DNA dos isolados**

131 O DNA genômico dos isolados foi extraído de acordo com Swanenburg
132 e outros (1998) com modificações. Os isolados bacterianos foram cultivados
133 em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI- Difco, Becton Dickinson, Sparks,
134 Md., U.S.A) a 35°C por 18 a 24 horas. A cultura bacteriana foi centrifugada a
135 12.000 x g por 8 min, o sedimento foi suspenso em 300 µl tampão de lise
136 (hidrocloridrato de guanidina 6M, 2 mercaptoetanol 1mM, EDTA 10mM,
137 Tween 80-0,1%) e congelado a -20°C por 30 min. seguido de fervura a 100°C
138 por 10min. Esse procedimento foi repetido duas vezes, após foi resfriado em
139 banho de gelo por 5 min. O DNA foi obtido após duas etapas de extração
140 com clorofórmio-álcool isoamílico (Merck, Darmstadt, Alemanha) (24:1, v/v).
141 O DNA foi precipitado com etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha),
142 centrifugado a 12.000 x g por 5 min e após secagem à temperatura ambiente
143 foi dissolvido em 50µl de água milli-Q.

144 A quantificação do DNA foi realizada em NanoDrop 2000.

145

146 **ERIC-PCR e REP-PCR**

147 Os iniciadores utilizados para ERIC-PCR foram ERIC-1R (5'-
148 ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC-2 (5'-
149 AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') e para REP-PCR REP-IRDT (5'-
150 IIINCGNCGNCATCNGGC-3') e REP2-DT (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3')
151 (Versalovic e outros 1991).

152 A reação de amplificação foi realizada adicionando 100 ng de DNA
153 bacteriano a uma mistura de reagentes, a qual continha 11µl de Master Mix
154 (Fermentas, GmbH, Germany), 1 µM de cada iniciador e água ultra pura livre
155 de DNase/RNase (Fermentas, GmbH, Germany) para um volume final de 25
156 µl, de acordo com as instruções do fabricante.

157 A amplificação dos produtos de PCR foi realizada em termociclador
158 Eppendorf Thermocycler (Mastercycler® gradient PCR, Hamburg, Germany).
159 Para ERIC-PCR foi programada uma desnaturação inicial a 94°C por 7 min,
160 seguida de 35 ciclos a 94°C por 30s, 52°C por 1 min e 72°C por 8 min com
161 uma extensão final a 72°C por 16 min. Para REP-PCR, programou-se uma
162 desnaturação a 94°C por 7 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30s, 45°C
163 por 1 min e 65°C por 8 min, com uma extensão final a 65°C por 16 min.

164 Após a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à
165 separação eletroforética em gel de agarose 1,5% (Amersham Pharmacia
166 Biotech AB, Uppsala - Suécia), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em
167 tampão 1XTBE (Tris-HCl 0,45mM, ácido bórico 0,45mM e EDTA 2,5mM pH
168 8,0), 7 a 10 V/cm² por 2 horas. Os produtos obtidos pela PCR foram
169 visualizados sob transiluminação em luz ultravioleta e fotodocumentados.

170 Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pares de base (Ladder –
171 *Amersham Pharmacia Biotech*, USA).

172 A análise dos perfis de bandas nos géis de agarose foi realizada pelo
173 software *BioNumerics (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem,*
174 *Belgium)* utilizando o coeficiente Dice de similaridade. Esse programa produz
175 uma matriz de similaridade e, por meio desse coeficiente, é gerado um
176 dendrograma baseado no coeficiente de agrupamento UPGMA algorithm
177 (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic averages*). Os valores iguais ou
178 maiores de 98% representaram amostras geneticamente idênticas.

179

180 **Poder discriminatório dos métodos**

181 O poder discriminatório (D) de ERIC-PCR e REP-PCR foi calculado
182 com base no índice de diversidade de Simpson, conforme apresentado por
183 Hunter e Gaston (1988).

184

185 **Detecção de fatores de virulência por PCR**

186 A presença dos genes que codificam toxinas de Shiga 1 e 2 (*stx1* e
187 *stx2*), intimina (*eae*) e enterohemolisina (*ehxA*) foi verificada usando os
188 iniciadores (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e as condições descritas na
189 Tabela 1.

190 A reação de amplificação foi realizada adicionando 100 ng de DNA
191 genômico em uma mistura de reagentes, que continha 11µl de Master Mix
192 (Fermentas, GmbH, Germany), 1µM de cada iniciador (Tabela 1) e água ultra

193 pura livre de DNase e RNase (Fermentas, GmbH, Germany) para um volume
194 final de 25 µl, de acordo com as instruções do fabricante.

195 A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Thermocycler
196 (Mastercycler® gradient PCR, Hamburg, Germany) e as condições de
197 amplificação para os genes *stx1*, *stx2* e *ehxA* foram: 95°C por 8 min., 35
198 ciclos a 95°C por 30s, temperatura de pareamento conforme a Tabela 1 por
199 30s, 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 1 min. Para o gene *eae*,
200 utilizou-se 94°C por 2 min., 35 ciclos a 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C
201 por 1 min. e extensão final a 72°C por 1 min.

202 Após a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à
203 separação eletroforética em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

204 Como controle para o gene *stx1* foi utilizada *E. coli* O157:H7 (C7-88) e
205 para os genes *stx2*, *eae* e *ehxA* utilizou-se *E. coli* O157:H7 (ATCC 43889)
206 gentilmente cedidas pelas Professoras Halha Ostrensky Saridakis e Jacinta
207 Sanchez Pelayo do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual
208 de Londrina. Um controle negativo (sem DNA) também foi incluído em cada
209 reação de PCR.

210

211 **Resultados e Discussão**

212 **ERIC-PCR e REP-PCR**

213 A análise eletroforética dos produtos de amplificação dos isolados de
214 *E. coli* gerados pelas técnicas ERIC-PCR e REP-PCR forneceu um padrão de
215 3 a 20 bandas com tamanho de aproximadamente 100 pb a 2.000 pb
216 (Figuras 1 e 2).

217 Considerando um nível de similaridade de 98%, ERIC-PCR diferenciou
218 os 87 isolados bacterianos em 76 perfis genômicos distintos. Sessenta e seis
219 isolados bacterianos apresentaram perfis exclusivos, 18 foram incluídos em
220 nove perfis genômicos que compreenderam dois isolados cada e um perfil
221 compreendeu três isolados (Figura 3). Os perfis genômicos 3 e 5 agruparam
222 dois isolados de *E. coli* em cada perfil (5L10 e 7L10; 11L3 e 12L3)
223 provenientes de duas amostras de leite processadas em dois laticínios.
224 Enquanto o perfil 7 agrupou três isolados (5L9, 6L9 e 7L9) provenientes de
225 uma única amostra de leite. Os perfis 1, 2, 4, 6, 8, 9 e 10 agruparam 14
226 isolados de *E. coli*, dois em cada perfil (3L3 e 4L3; 5L14 e 9L14; 6L3 e 7L3;
227 3L16 e 4L16; 1L1 e 2L1; 4L8 e 6L8; 8L8 e 11L8) provenientes de diversas
228 amostras de leite processadas em cinco laticínios em datas diferentes (Figura
229 3).

230 Na análise por REP-PCR, considerando um nível de similaridade de
231 98%, os 87 isolados de *E. coli* foram agrupados em 81 diferentes perfis
232 genômicos. Setenta e cinco isolados apresentaram perfis únicos e 12 foram
233 agrupados em seis perfis com dois isolados cada. Os isolados de *E. coli*
234 agrupados nos perfis 1 a 6 (1L7 e 2L7; 2L10 e 3L10; 9L3 e 10L3; 2L19 e
235 3L19; 10L14 e 11L14; 6L9 e 7L9) eram provenientes de seis amostras de
236 leite processadas em seis laticínios (Figura 4).

237 É importante salientar que diferentes isolados bacterianos
238 provenientes de uma mesma amostra de leite foram submetidos à tipagem
239 molecular pois em estudo realizado anteriormente em nosso laboratório os

240 mesmos apresentaram diferentes perfis bioquímicos ou de resistência a
241 antimicrobianos.

242 Na análise conjunta por ERIC e REP-PCR, dos 87 isolados de *E. coli*,
243 77 apresentaram perfis únicos e quatro foram agrupados em dois perfis com
244 dois isolados cada (10L14 e 11L14; 6L9 e 7L9) (Figura 5). Os isolados 6L9 e
245 7L9 foram considerados idênticos tanto por ERIC quanto por REP-PCR.

246 Ressaltamos que REP-PCR agrupou apenas isolados bacterianos
247 provenientes de mesmas amostras de leite, enquanto por ERIC-PCR, 14
248 isolados de amostras de leite diferentes foram considerados idênticos.
249 Nenhuma das duas técnicas agrupou isolados bacterianos provenientes de
250 leite processado em laticínios diferentes. Os perfis de ERIC-PCR que
251 agruparam isolados de *E. coli* de amostras de leite processadas em datas
252 diferentes indicam que a contaminação do leite ocorreu por um mesmo clone
253 dentro de um mesmo laticínio e que a fonte de contaminação se manteve ao
254 longo do tempo. Esse resultado alerta para falhas no processamento e para
255 a necessidade de medidas de controle para minimizar a contaminação por *E.*
256 *coli*.

257 ERIC-PCR teve um poder discriminatório ligeiramente inferior
258 ($D=0,9967$) quando comparado com REP-PCR ($D=0,9983$). Já na análise
259 conjunta de ERIC e REP-PCR o poder discriminatório foi 0,9994. Importante
260 lembrar que segundo Hunter e Gaston (1988), um índice maior que 0,90 é
261 seguro para que os resultados de tipagem sejam interpretados com
262 confiança.

263 Os resultados mostraram elevada diversidade genética entre os
264 isolados de *E. coli*. Resultados semelhantes foram descritos por outros
265 autores. Wenz e outros (2006), observaram alto grau de variabilidade
266 genotípica, quando utilizaram ERIC-PCR para genotipagem de *E. coli*
267 provenientes de leite de vaca com mastite. Ling e outros (2000) também
268 obtiveram elevada heterogeneidade genética em *E. coli* O157:H7 isoladas
269 de hambúrguer de frango e bovino por ERIC-PCR, onde cada isolado
270 apresentou um perfil genético único, mostrando o elevado poder
271 discriminatório do método. *E. coli* isoladas de carne de carneiro também
272 demonstraram elevada diversidade genética em estudo descrito por Bhong
273 (2006) utilizando ERIC-PCR e REP-PCR. REP-PCR também foi eficiente
274 para comparar isolados de *E. coli* provenientes de leite de cabra e do
275 ambiente de ordenha, contribuindo para o monitoramento da qualidade do
276 leite de cabra (Olivindo 2007).

277 Em estudo semelhante ao nosso, Rantsiou e outros (2012), avaliaram
278 a diversidade genética de STEC obtidas de derivados lácteos não
279 pasteurizados e de produtos cárneos, utilizando ERIC-PCR. Ao considerarem
280 um coeficiente de similaridade de 70% os autores obtiveram um poder
281 discriminatório baixo. No entanto, se considerarmos o mesmo coeficiente de
282 similaridade utilizado no presente estudo (98%), os 53 isolados de STEC são
283 agrupados em 48 perfis, sendo 46 perfis únicos e dois que agruparam dois e
284 cinco isolados em cada, obtendo-se também elevada diversidade entre os
285 isolados avaliados. Os autores também observaram que os isolados
286 provenientes de produtos lácteos eram mais semelhantes, enquanto que os

287 isolados provenientes de derivados cárneos eram mais heterogêneos. Além
288 disso, pode ser observada correlação dos grupos genômicos com o genótipo
289 de virulência.

290 Diferente dos resultados obtidos no presente estudo, ERIC-PCR não
291 foi capaz de diferenciar *E. coli* O157:H7 isolada de alimentos, humanos e
292 animais em estudo realizado por Giammanco e outros (2002).

293 A elevada diversidade genética observada no presente estudo pode
294 ser justificada pelas diversas fontes de contaminação do leite bovino por *E.*
295 *coli*, durante todo o processo de produção.

296

297 **Pesquisa de genes de virulência**

298 Não foram detectados os genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae* e *ehxA*
299 nos isolados de *E. coli* analisados. Resultados semelhantes foram
300 observados por Carneiro e outros (2006) que não detectaram a presença dos
301 genes *stx1*, *stx2* e *eae* em *E. coli* isolada de leite bovino pasteurizado
302 comercializado no Rio de Janeiro, Brasil. No entanto, Manna e outros (2006)
303 observaram a presença do gene *stx2* em isolados de *E. coli* O157
304 provenientes de leite pasteurizado na Índia.

305 A maioria dos estudos relata a presença de STEC apenas em leite cru
306 e derivados em diferentes partes do mundo. Farzam e outros (2012)
307 detectaram os genes *stx1* e *stx2* em 16 dos 44 isolados (36,36%) e em
308 79,54% (35/44) dos isolados, respectivamente, enquanto o gene *eae* não foi
309 detectado e o gene *hlyA* estava presente em 11,36% (5/44) dos isolados de
310 *E. coli* de leite bovino cru. Altalhi e Hassan (2009) verificaram a presença do

311 gene *eae* em 9,1% dos isolados de *E. coli* provenientes de leite bovino cru e
312 dos genes *stx1* e *stx2* em 3% e 6,1% dos isolados, respectivamente.
313 Solomakos e outros (2009) observaram que 33% dos isolados de *E. coli* de
314 leite bovino cru apresentavam os genes *stx1* ou *stx2*, *eae* e *ehxA* e
315 pertenciam ao sorotipo O157:H7. A prevalência de STEC foi pesquisada por
316 Islam e outros (2010) em diferentes alimentos, entre eles leite cru, onde 10%
317 das amostras apresentavam os genes *stx*, porém os genes *eae* e *ehxA* não
318 foram detectados.

319 No Brasil, Vicente e outros (2005) detectaram os genes *stx1* e *stx2* em
320 3,3% dos isolados de *E. coli* provenientes de amostras de leite coletadas
321 durante o processo da ordenha em São Paulo. Entretanto, os genes *stx1*,
322 *stx2* e *eae* não foram identificados em amostras de leite cru provenientes do
323 Sul do Brasil (Timm e outros 2009), semelhante aos resultados obtidos no
324 presente estudo.

325 O gado bovino é considerado o principal reservatório de STEC
326 (Farrokh e outros 2012) e no Brasil alguns estudos relatam alta prevalência
327 desta bactéria em gado bovino, tanto de corte quanto de leite (Irina e outros
328 2005; Vicente e outros 2005; Oliveira e outros 2008,). No entanto, semelhante
329 aos resultados do presente estudo, outros autores demonstraram baixa
330 prevalência de STEC em leite, carnes e derivados (Vicente e outros 2005;
331 Carneiro e outros 2006; Bergamini e outros 2007), Paneto e outros 2007;
332 Timm e outros 2009; Martins e outros 2011).

333 Apesar da não detecção de genes de STEC, a presença de *E. coli* em
334 leite pasteurizado além de indicar contaminação de origem fecal e práticas

335 higiênico sanitárias inadequadas, não descarta a possibilidade da presença
336 de outros patótipos de *E. coli* que podem trazer risco à saúde dos
337 consumidores.

338 O conhecimento da epidemiologia de *E. coli* diarréiogênicas em leite
339 pasteurizado é de fundamental importância para o entendimento de sua
340 transmissão, além de dar subsídios para o desenvolvimento e a implantação
341 de medidas de controle ao longo da cadeia produtiva. A pesquisa de fatores
342 de virulência de outros patótipos de *E. coli* é importante para avaliar o
343 potencial do leite pasteurizado comercialmente disponível como veículo de
344 transmissão desta bactéria.

345

346 **Conclusão**

347 As técnicas de ERIC e REP-PCR mostraram alta diversidade genética
348 de *E. coli* isolada de leite bovino pasteurizado o que confirma a possibilidade
349 do seu uso em estudos epidemiológicos. Os isolados bacterianos não
350 apresentaram os genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, normalmente presentes em
351 STEC, o que indica a baixa prevalência desse patógeno no leite produzido na
352 região estudada.

353

354 **Referências**

355 Altalhi AD, Hassan SA. 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by
356 *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers.
357 Food Control 20: 913–17.

358

- 359 Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J.
360 2004. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga
361 Toxin(Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients:
362 Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. J Clin Microbiol 42:311–
363 19.
- 364
- 365 Bergamini AMM, Simões M, Irino K, Gomes TAT, Guth BEC. 2007.
366 Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli*
367 (STEC) strains in ground beef in são paulo. brazil Brazilian Braz J Microbiol
368 38: 553-56.
- 369
- 370 Bhong CD, Brahmhatt MN, Joshi CG, Rank DN. 2008. Detection of virulence
371 determinants by real time PCR in *E. coli* isolated from mutton Meat. [Tese].
372 Gujarat, Índia: Anand Agricultural University. 78 p.
- 373
- 374 Carneiro LAM, Lins MC, Garcia FRA, Silva APS, Mauller PM, Alves GB, Rosa
375 ACP, Andrade JRC, Freitas-Ameida AC, Queiroz MLP. 2006. Phenotypic and
376 genotypic characterization of *Escherichia coli* strains serogrouped as
377 enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurized milk. Int J Food
378 Microbiol 108:15-21.
- 379
- 380 CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2012. *Escherichia coli*
381 O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Disponível

382 em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/ecoli_o157h7/.
383 Acesso fevereiro 12, 2012.
384
385 Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S,
386 Thevenot D, Condron R, De Reu K, Alexander Govaris, Heggum
387 K,Heyndrickx M,Hummerjohann J, Lindsay D, Mischczycha S, Moussiegt S,
388 Verstraete K, Cerf O. 2012. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*
389 (STEC) and their significance in dairy production. Int J Food Microbiol 1-23.
390
391 Farzan R, Rahimi E, Montaz H. 2012. virulence properties of shiga toxin-
392 producing *Escherichia coli* isolated from iranian raw milk and dairy products.
393 Slov Vet Res 49:159:66.
394
395 FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. Food Outlook, Global Market
396 Analysis. Disponível em: <http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>.
397 Acesso março, 20, 2012.
398
399 Giammanco GM, Pignato S, Grimont F, Grimont PAD, Caprioli A, Morabito S,
400 Giammanco G. 2002. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia*
401 *coli* O157:H7 Isolated in Italy and in France. J Clin Microbiol 40:4619:24.
402
403 Hunter PR, Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of
404 typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol
405 26: 2465-66.

- 406 Ibenyassine K, AitMhand R, Karamoko Y, Cohen N. 2006. Use of repetitive
407 DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic
408 *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with
409 contaminated irrigation water. Appl Microbiol 43:528-33.
- 410 Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Ramos II, Souza MAC, Cruz AS, Gomes TAT
411 Gomes Vieira MAM, Guth BEC. 2005. Serotypes and virulence markers of
412 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in
413 São Paulo State, Brazil. Vet Microbiol 105:29-36.
- 414
- 415 Islam MA, Mondol AS, Azmi IJ, Boer E, Beumer RR, Zwietering MH,
416 Heuvelink AE, Talukder KA. 2012. Occurrence and characterization of Shiga
417 Toxin-Producing *Escherichia coli* in Raw Meat, Raw Milk, and Street Vended
418 Juices in Bangladesh. Foodborne Path Dis 7: 1381-85.
- 419
- 420 Ling O W , Radu S, Rusul G, Karim M I, Purwati E, Lihan S. 2000.
421 Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus (ERIC) Genotyping of
422 *Escherichia coli* O157:H7. Pakistan J Biol Sci 3:35-7.
- 423 Manna SK, Brahmane MP, Das R, Manna C, Batabyal S. 2006. Detecção of
424 *Escherichia coli* O157 in foods of animal origin by culture and multiplex
425 polymerase chain reaction. J Food Sci Technol 46: 77-9.
- 426
- 427 Martins RP, Nakazato L, Dutra V, Leite DS. 2011. Analysis of virulence genes
428 in *Escherichia coli* isolated from grated cheese. Ciênc Tecnol Aliment 31: 106-
429 8.

430

431 MilkPoint. 2012. Consumo de lácteos tem expansão. Disponível em:
432 [http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/consumo-de-lacteos-](http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/consumo-de-lacteos-tem-expansao-78049n.aspx)
433 [tem-expansao-78049n.aspx](http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/consumo-de-lacteos-tem-expansao-78049n.aspx). Acesso fevereiro, 12, 2012.

434

435 Mittelstaedt S, Carvalho VM. 2006. *Escherichia coli* enterohemorrágica
436 (EHEC) O157:H7- Revisão. Ver Inst Ciênc Saúde 24:175-82.

437

438 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 2007. Manual of
439 Clinical Microbiol. 9 ed. Washington: ASM-Press. 2488 p.

440

441 Olivindo CS. 2007. Detecção de microrganismos utilizando a técnica de PCR
442 em Sequencias Palindromicas Extragênicas Repetidas (REP-PCR) no
443 monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha.
444 [Dissertação]. Fortaleza, Brasil: Universidade Federal do Ceará. 64 p.

445

446 Oliveira MG, Brito JRF, Gomes TAT, Guth BECG, Vieira MAM, Naves ZVF,
447 Vaz TMI, Irino K. 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing
448 *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. Int J Food
449 Microbiol 127:139-46.

450

451 Paneto BR, Schocken-Iturrino RP, Macedo C, Santo E, Marin JM. 2007.
452 Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. Arq Bras
453 Med Vet Zootec 59:508-12.

454

455 Paton AW, Paton JC. 1998. Detection and Characterization of Shiga
456 Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2,
457 eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. J Clinical
458 Microbiol 11:598-602

459

460 Rahimi E, Chaleshtori SS, Parsaei P. 2011. Prevalence and antimicrobial
461 resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from traditional cheese, ice cream
462 and yoghurt in Iran. African J Microbiol 5:3706-10.

463

464 Rantsiou K, Alessandria V, Cocolin L. 2012. Prevalence of Shiga toxin-
465 producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by
466 molecular methods. Int J Food Microbiol 154:37–43.

467

468 Swanenburg M, Urlings HAP, Keuzenkamp DA, Snijders JMA. 1998.
469 Validation of ERIC-PCR as a tool in epidemiology research of *Salmonella* in
470 slaughter pigs. J Ind Microbiol Biotechn 21:141-44.

471 Solomakos N, Govaris A, Angelidis A.S, Pournaras S, Burriel A.R, Kritas S.K,
472 Papageorgiou D.K. 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic
473 resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and
474 ovine milk in Greece. Food Microbiol 26: 865-71.

475

476 Timm CD, Conceição FR, Menin A, Conceição RCS, Dellagostin OA, Aleixo
477 JAG. 2009. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in southern
478 Brazil isolated from ground beef and raw milk. *Ciênc Anim Brasi* 10:641-49.

479

480 Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA
481 sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial
482 genomes. *Nucl Acids Res* 19:6823-31.

483

484 Vicente HIG, Amaral LA, Cerqueira AMF. 2005. Shigatoxigenic *Escherichia*
485 *coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples from
486 dairy farms. *Brazilian J Microbiol* 36:217-22.

487

488 Zanella GN, Mikcha JMG, Bando E, Siqueira VLD, Machinski Jr. M. 2010.
489 Occurrence, antibiotic resistance of coliforms and antimicrobial residues from
490 cow's milk in Brazil. *J Food Prot* 73: 1684-87.

491

492 Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ. 2006.
493 *Escherichia coli* Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and
494 Clinical Coliform Mastitis Severity. *J Dairy Sci* 89: 3408–12.

495

496

497

498

499

500 **Agradecimentos**

501 Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
502 de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária e pelo Programa de Pós-
503 Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores e tamanhos dos produtos de amplificação por PCR.

Gene	Iniciador	Sequências de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>stx1</i>	VT1-A	F:CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC	302	58°	Blanco e outros, 2004
	VT1-B	R:CGTGGTATAGCTACTGTCACC			
<i>stx2</i>	VT2-A	F:CTTCGGTATCCTATTCCCGG	516	60°	Blanco e outros, 2004
	VT2-B	R:CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC			
<i>ehxA</i>	hlyAP	F:GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	58°	Paton e Paton, 1998
	hlyAR	R:AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
<i>eae</i>	EAE-1	F:GAGAATGAAATAGAAGTCGT	775	55°	Blanco e outros, 2004
	EAE-2	R:GCGGTATCTTTCGCGTAATCGCC			

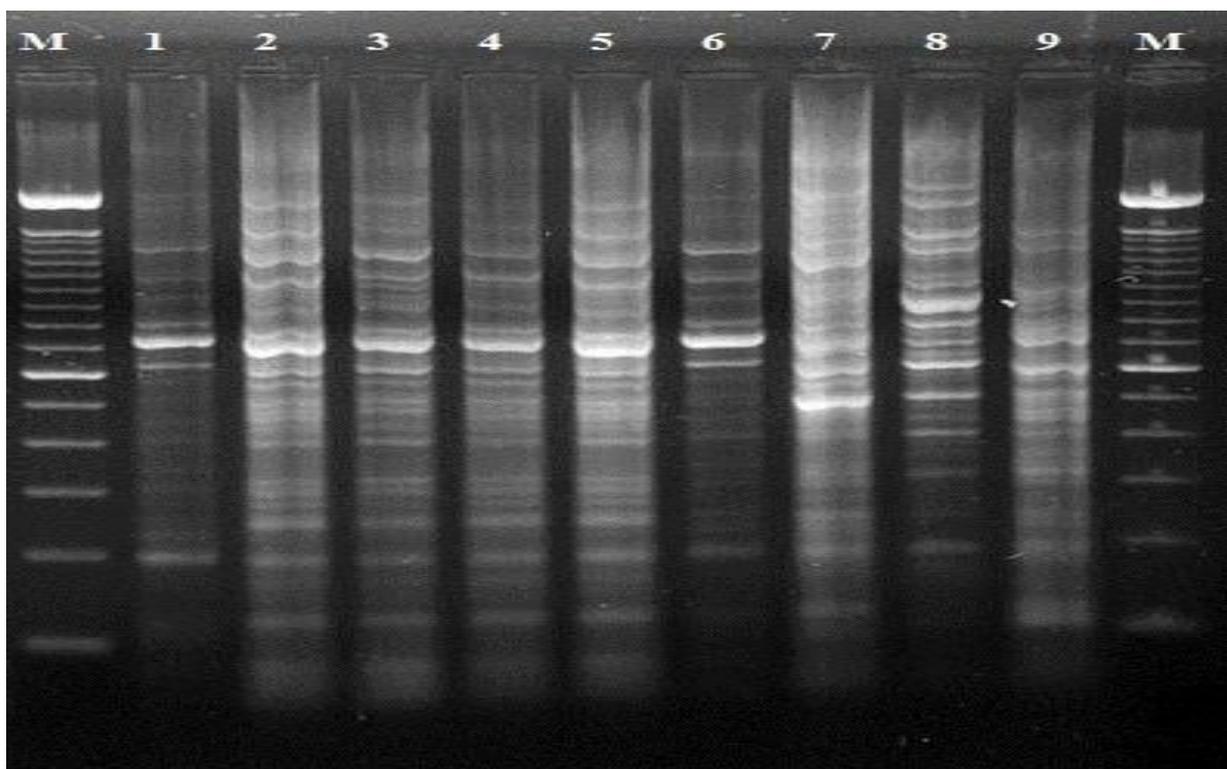


Fig. 1 Eletroforese gel de agarose 1.5% ERIC-PCR. M: Marcador de peso molecular 100bp. Canaletas 1 a 9: Isolados de *E. coli*.

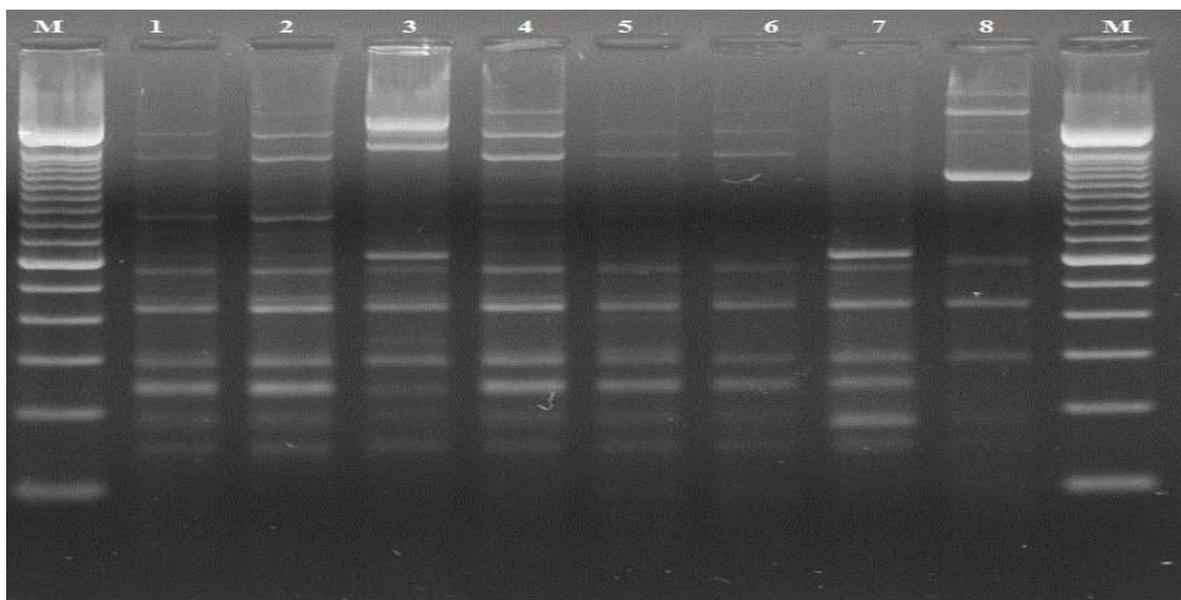


Fig. 2 Eletroforese gel de agarose 1.5% REP-PCR. M: Marcador de peso molecular 100bp. Canaletas 1 a 8: Isolados de *E. coli*.

ERIC-PCR

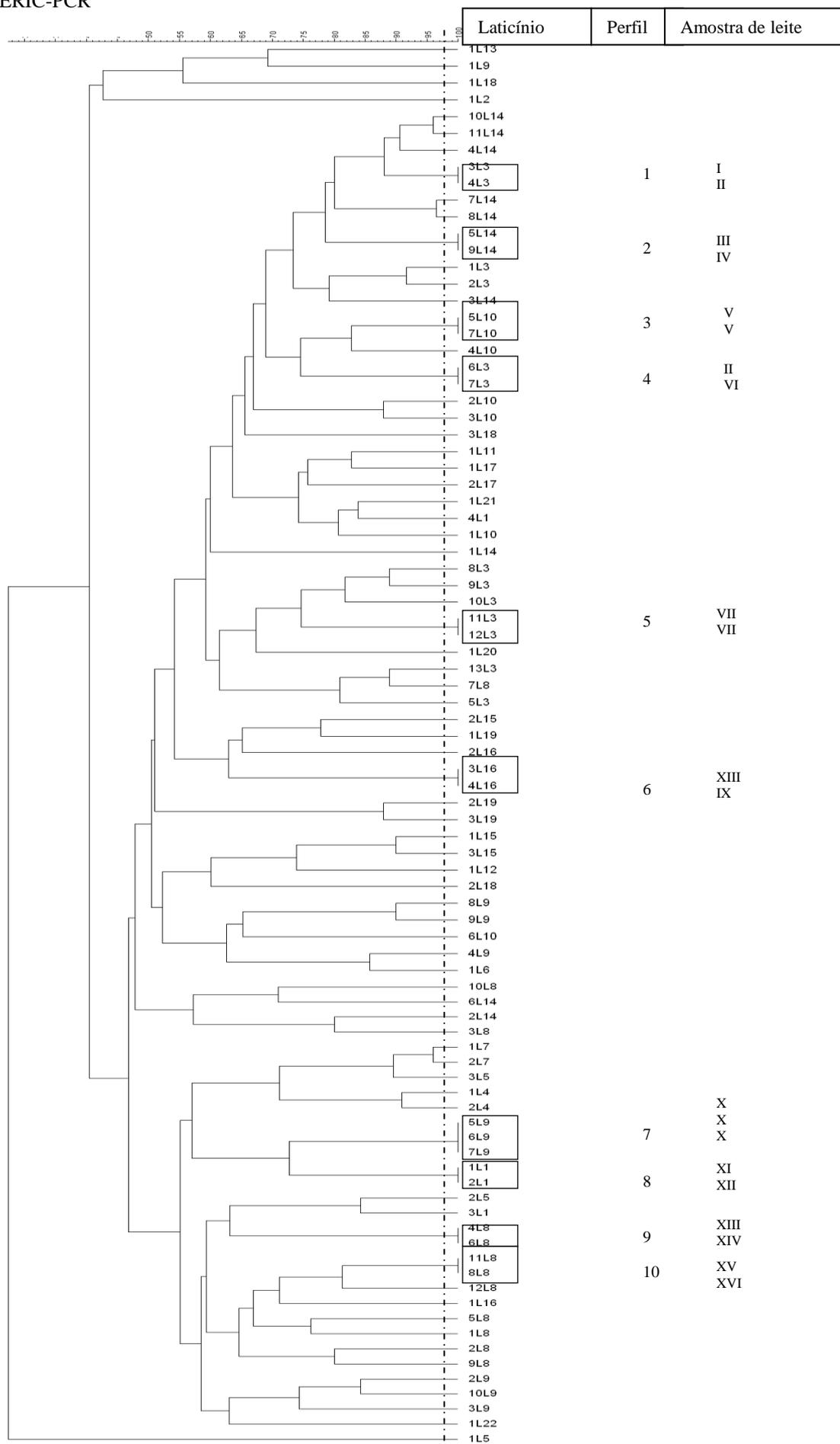


Fig. 3 Dendrograma gerado por agrupamento UPGMA, baseado na análise de ERIC-PCR, de 87 isolados de *E. coli* obtidos de leite bovino pasteurizado. A linha vertical divide o dendrograma a partir do nível de similaridade de 98%.

REP-PCR

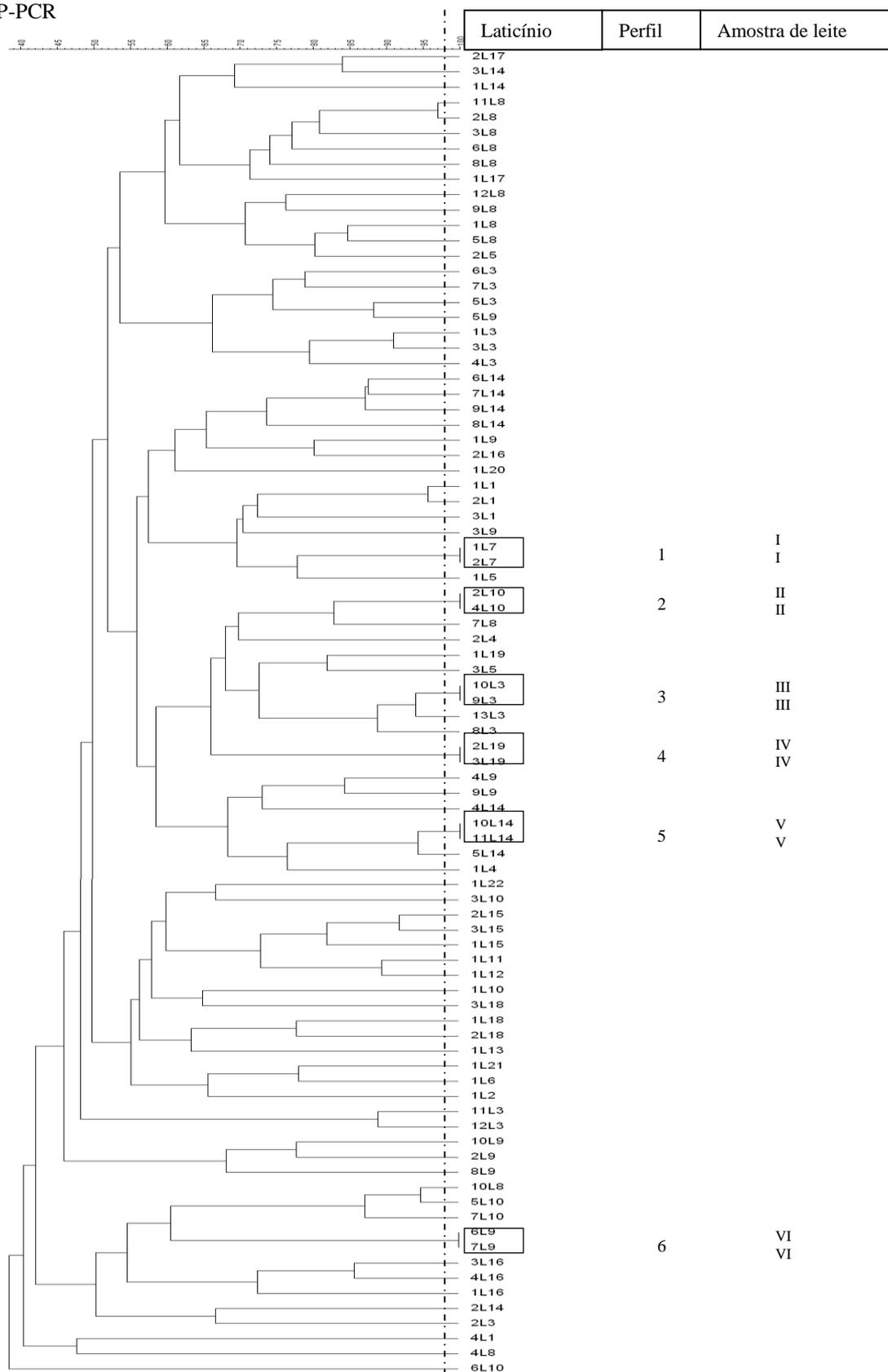


Fig. 4 Dendrograma gerado por agrupamento UPGMA, baseado na análise de REP-PCR, de 87 isolados de *E.coli* obtidos de Leite bovino pasteurizado. A linha vertical divide o dendrograma a partir do nível de similaridade de 98%.

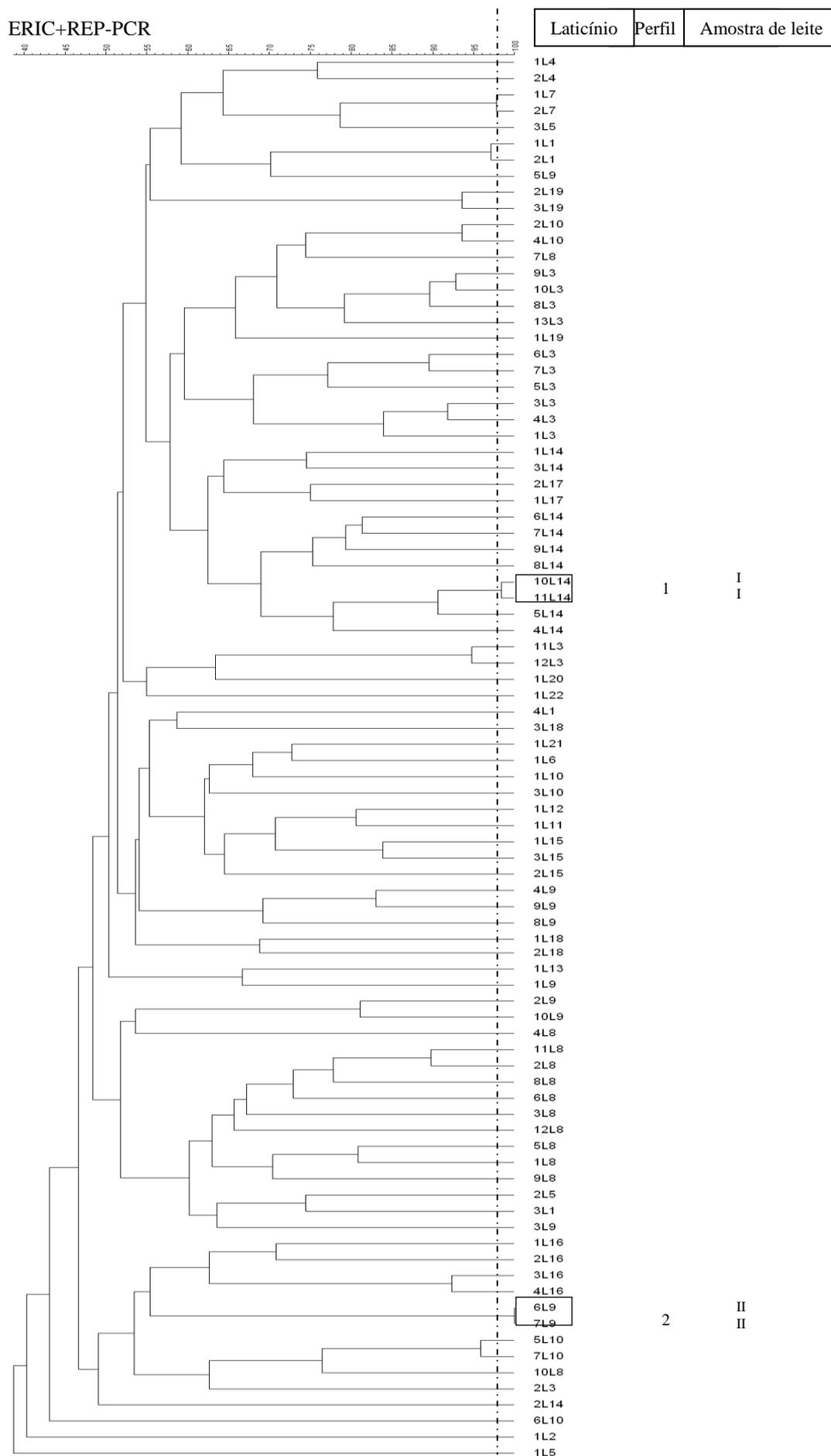


Fig. 5 Dendrograma gerado por agrupamento UPGMA, baseado na análise combinada de ERIC-PCR e REP-PCR, de 87 isolados de *E.coli* obtidos de leite bovino pasteurizado. A linha vertical divide o dendrograma a partir do nível de similaridade de 98%.

