



OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA EM PRODUTOS CÁRNEOS FERMENTADOS

Max de Santana Nazário da **Silva**¹; Miriam Gonçalves **Marquezini**²; Thais **Marini**²; Rafaella
Fabiana Pereira **Carneiro**³; Renata **Bromberg**⁴

Nº 20233

RESUMO

Escherichia coli O157:H7 produtora de toxina Shiga constitui-se em um dos principais patógenos presentes em produtos cárneos fermentados, sobretudo em salames, o que torna importante a detecção desse microrganismo para garantir a segurança microbiológica destes produtos. O objetivo deste estudo foi o de avaliar 30 amostras de salames adquiridas no comércio da cidade de Campinas com o intuito de identificar a presença da *E. coli* O157:H7, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). A avaliação da sensibilidade da metodologia usada indicou que seu limite de detecção em amostras de salame artificialmente inoculadas é de 10^3 UFC/g. As amostras analisadas não apresentaram genes para *E. coli* O157:H7, indicando que estas amostras de salame devem apresentar barreiras que impedem a sobrevivência e o crescimento deste patógeno.

Palavras-chaves: *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), salame, técnica de PCR em Tempo Real, segurança microbiológica.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas-SP; m174746@dac.unicamp.br

2 Colaborador, Assistente Técnico: Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL, Campinas-SP.

3. Colaborador: Assistente de qualidade, bioBoaVista, Valinhos-SP.

4 Orientador: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; renatab@ital.sp.gov.br



ABSTRACT

Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 is one of the main pathogens present in fermented meat products, especially in salami, which makes it important to detect this microorganism to ensure the microbiological safety of these products. The objective of this study was to evaluate 30 samples of salami purchased in the city of Campinas in order to identify the presence of E. coli O157:H7, using the Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique. The evaluation of the sensitivity of the methodology indicated that its detection limit in artificially inoculated salami samples is 10³ CFU/g. The analyzed samples did not present genes for E. coli O157:H7, indicating that these samples of salami must present barriers that prevent the survival and growth of this pathogen.

Keywords: *Escherichia coli O157:H7, Shiga-toxin producing Escherichia coli (STEC), salami, Real-time PCR technique, microbiological safety.*

1 INTRODUÇÃO

E. coli O157:H7 foi reconhecida como um patógeno humano em 1982, durante surtos ocasionados pelo consumo de hambúrgueres sub processados termicamente preparados em uma rede de *Fast Food* nos Estados Unidos. É uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, a qual é constituída por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos. Em geral, são encontradas na porção distal do trato gastrointestinal, mais precisamente no colón e ceco, de animais de sangue quente, incluindo os humanos. Apesar de serem constituintes da microbiota intestinal, também são encontradas de forma livre no ambiente. No entanto, algumas linhagens dessa espécie de bactéria podem ocasionar severos sintomas adversos intestinais ou extra intestinais ao consumidor, tais como infecções urinárias, síndrome hemolítico-urêmica e septicemia (BAKAS et al., 2013).

E. coli O157:H7 constitui um importante vetor de doenças de origem alimentar e pertence a um grupo de linhagens patogênicas de *E. coli*, conhecidas como enterohemorrágicas (EHEC) ou produtoras de toxinas Shiga (STEC), similares à produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I. As linhagens de STEC produzem duas toxinas com elevado potencial patogênico, as quais são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, que podem ser transmitidos e incorporados nos cromossomos bacterianos (GYLES, 2007). Apesar da incidência deste microrganismo ser relativamente baixa, apresenta um sério perigo a saúde do consumidor, devido a taxa de mortalidade associada às infecções, sobretudo em crianças e idosos (GARCIA et al., 2008).

O salame é um produto cárneo industrializado, o qual é consumido sem a necessidade de ser submetido a um tratamento prévio de cozimento, pois seus processos de produção visam garantir



sua estabilidade microbiológica e prolongar sua vida útil. As barreiras microbiológicas deste produto são asseguradas por meio da atuação sinérgica de diversos fatores físico-químicos, como atividade de água reduzida, baixo valor de pH e presença de sais de cura (nitrito e nitrato), que devem contribuir positivamente para o controle do crescimento de patógenos. Porém, a capacidade de *E. coli* O157:H7 se adaptar a condições de alta acidez (DUFFY et al., 2000) fez com que este microrganismo fosse considerado um dos patógenos mais perigosos em produtos cárneos fermentados. Vários estudos têm mostrado que *E. coli* O157: H7 é capaz de sobreviver aos processos de fermentação, secagem e armazenamento (GLASS et al., 1992; HINKENS et al., 1996; NISSEN & HOLCK, 1998). Além disso, já foram reportados surtos de *E. coli* O157:H7 em salame, evidenciando a susceptibilidade deste produto frente a este microrganismo (WILLIAMS et al., 2000). Diante da necessidade de se conhecer a disseminação de *E. coli* O157:H7 dentre os produtos cárneos fermentados, o objetivo deste estudo foi o de avaliar a ocorrência desta bactéria em salames obtidos em supermercados de Campinas, SP.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem e conservação dos microrganismos

Foram testadas culturas de referência de *E. coli*, *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O157:H7 desprovida dos genes *stx1* e *stx2*, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) e obtidas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As culturas foram mantidas em caldo Triptona de Soja (TSB) suplementado com 15% de glicerol a 4°C até o momento do uso. As culturas foram ativadas em caldo TSB e incubadas a 35°C/24h.

2.2 Método de detecção de *E. coli* produtoras de toxina Shiga

A detecção de *E. coli* produtora de toxina Shiga foi realizada pelo método MLG 5C do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2019) com adaptações. Neste estudo foi usado o termociclador QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems™, EUA) em substituição ao termociclador ABI 7500 FAST® (Applied Biosystems™, EUA). Esta substituição afeta o número de canais disponíveis, causando uma redução de cinco para três canais com o uso do QuantStudio 3™. Desta forma, o desenho experimental da amplificação do DNA e das sondas usadas no experimento foi alterado conforme descrito no item 2.2.1.

2.2.1 Seleção dos *primers* e sondas

Neste trabalho, foram selecionados oligonucleotídeos específicos que codificam as toxinas Shiga 1 e 2 (*stx1* e *stx2*), a intimina (*eae*), o gene flagelar H7 (*fliCH7*) e o oligonucleotídeo universal 16S rRNA de *E. coli* O157:H7 para a detecção simultânea de genes presentes em EHEC O157:H7

por PCR em Tempo Real (RT-PCR). As sequências em questão são indicadas no protocolo MLG 5C (USDA, 2019), e estão descritas nas Tabelas 1 e 2. Como controle interno positivo nas reações de PCR foi utilizado o VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control - VIC™ Assay (Applied Biosystems) em conjunto com o VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA (Applied Biosystems) ao invés dos oligonucleotídeos para o gene 16S rRNA.

Tabela 1. Primers usados nas reações de RT-PCR.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Alvo
Stx-F	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG	<i>stx</i>
Stx-R	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACD TC	
Eae-F	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA	<i>eae</i>
Eae-R	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM	
FliCH7-F	TAC CAT CGC AAA AGC AAC TCC	<i>fliCH7</i>
FliCH7-R	GTC GGC AAC GTT AGT GAT ACC	
16S RNA-F	CCT CTT GCC ATC GGA TGT G	16S rRNA
16S RNA-R	GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC	

F: Forward; R: Reverse.

Tabela 2. Sondas usadas nas reações de RT-PCR.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Alvo
Stx1_FAM	6FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-QSY	<i>stx1</i>
Stx2_FAM	6FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-QSY	<i>stx2</i>
Eae_ABY	ABY-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-QSY	<i>eae</i>
FliCH7_FAM	6FAM-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-QSY	<i>fliCH7</i>
16S Ecoli_VIC	VIC-CGG CTG CCG CGA CAT CTT CAA T-QSY	16S rRNA

2.2.2 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método de lise térmica adaptado do protocolo MLG 5C (USDA, 2019). Para tanto, após a etapa de enriquecimento em caldo Tripton de Soja (TSB) Modificado com Novobiocina a 20mg, um volume de 1mL de amostra foi transferido assepticamente com o auxílio de micropipeta para um tubo tipo Eppendorf, o qual foi submetido à centrifugação a 9.000rpm por 4min e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 100µL de água deionizada estéril e esta suspensão foi homogeneizada com o auxílio de micropipeta. Os tubos foram submetidos ao congelamento a -82°C por 15min, após aquecimento em banho seco a 90°C por 15min. Os DNAs bacterianos foram estocados a -20±2°C até o momento da amplificação.

2.2.3 Amplificação do DNA por RT-PCR

As reações de amplificação foram divididas em 4 grupos: 1) Detecção de *stx* e *eae* com 16S rRNA (controle interno) em amostras de DNA obtidas a partir de culturas de *E. coli*; 2) Detecção de

fliCH7 com 16S rRNA (controle interno) em amostras de DNA obtidas a partir de culturas de *E. coli*; 3) Detecção de *stx* e *eae* com VetMAX™ Xeno™ (controle interno) em amostras de salame; 4) Detecção de *fliCH7* com VetMAX™ Xeno™ (controle interno) em amostras de salame. Em todas as reações, foi utilizado o Applied Biosystems® TaqMan® Environmental Master Mix 2.0. Para cada reação foi preparada uma solução mix (Tabela 3) das quais transferiu-se 20µL para poços de uma microplaca de 96 poços e, em seguida, adicionou-se 5µL do DNA extraído. Como controles positivo e negativo da reação, utilizou-se DNA de uma linhagem de *E. coli* O157:H7 e água deionizada, respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas na plataforma QuantStudio™ 3 com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 10min, 35 ciclos a 95°C por 15s (desnaturação) e 59°C por 1min (anelamento e extensão).

Para cada ensaio, avaliou-se as amplificações dos controles e os valores de Ct (*Cycle threshold*): as amostras consideradas positivas apresentaram valores de Ct ≤ 35, desde que os controles positivos de cada ensaio apresentassem amplificação e os negativos, por sua vez, ausência de leitura de fluorescência (sem amplificação). No caso das reações 3 e 4, avaliou-se também a amplificação do controle interno (VetMAX™ Xeno™) de forma a excluir possíveis falso-negativos.

Tabela 3. Reações de RT-PCR para detecção de *E. coli* O157:H7.

Reagente	Reação (µL)				Concentração final (µM)
	1	2	3	4	
Environmental Master Mix 2.0*	12,5	12,5	12,5	12,5	1X
Stx-F	0,63	-	0,63	-	1,25
Stx-R	0,63	-	0,63	-	1,25
Eae-F	0,5	-	0,5	-	1
Eae-R	0,5	-	0,5	-	1
FliCH7-F	-	0,25	-	0,25	1
FliCH7-R	-	0,25	-	0,25	1
16S RNA-F	0,2	0,2	-	-	0,16
16S RNA-R	0,2	0,2	-	-	0,16
Stx1_FAM	1,25	-	1,25	-	0,25
Stx2_FAM	1,25	-	1,25	-	0,25
Eae_ABY	1	-	1	-	0,2
FliCH7_FAM	-	1	-	1	0,2
16SEcoli_VIC	0,5	0,5	-	-	0,1
VetMAX™ Xeno™ VIC™ Assay**	-	-	1	1	1X
VetMAX™ Xeno™ DNA**	-	-	0,5	0,5	50
DNA	5	5	5	5	ND
Água q.s.p.	25	25	25	25	-

* Applied Biosystems® TaqMan®; ** Internal Positive Control; ND – Não detectado; F: Forward; R: Reverse.

2.3 Determinação do limite de sensibilidade da detecção de *E. coli* O157:H7 por RT-PCR

Para o teste de sensibilidade foi usada uma amostra de salame desprovida de gene específico para *E. coli* O157:H7. Para tanto, porções de 25g da amostra foram retiradas assepticamente, transferidas para um saco de amostragem estéril e armazenadas a 4°C.

A partir do *pool* das culturas de *E. coli* O157:H7, descritas no item 2.1, foi transferida uma alíquota de 1mL para um tubo de ensaio contendo caldo TSB, o qual foi incubado a 35°C por 24h e, na sequência foram realizadas diluições seriadas de 1:10 até a diluição -5 em água peptonada tamponada. Alíquotas de 1mL de cada diluição foram inoculadas nas amostras de salame (amostras A1 – A5) e também transferidas para tubos cônicos (amostras D1 – D5) (Tabela 4). Em seguida, foram retiradas alíquotas de 1mL de cada amostra para a extração de DNA (item 2.2.2), sendo que as amostras de salame foram antes incubadas a 42°C por 24h. A partir dos extratos de DNA provenientes dos caldos de diluição e das amostras de salame foi realizada a detecção de *E. coli* O157:H7, conforme descrito no item 2.2.

Tabela 4. Identificação das amostras do teste de sensibilidade.

Amostra	Descrição	Concentração (UFC/g)
A1	Salame comercial + inóculo -1	10 ⁵
A2	Salame comercial + inóculo -2	10 ⁴
A3	Salame comercial + inóculo -3	10 ³
A4	Salame comercial + inóculo -4	10 ²
A5	Salame comercial + inóculo -5	10 ¹
D1	Caldo de diluição -1	10 ⁵
D2	Caldo de diluição -2	10 ⁴
D3	Caldo de diluição -3	10 ³
D4	Caldo de diluição -4	10 ²
D5	Caldo de diluição -5	10 ¹

2.4 Detecção de *E. coli* O157:H7 em amostras de salames comerciais

2.4.1 Amostras

Foi analisado um total de 30 amostras de salames adquirido no comércio da cidade de Campinas, S.P. no período de janeiro a março de 2020. A temperatura das amostras foi monitorada durante a coleta e oscilou entre 22°C e 25°C.

2.4.2 Análises microbiológicas

Para a detecção de *E. coli* O157:H7 foi retirada uma porção de 50g das amostras de salame a qual foi transferida para um saco para amostragem estéril. Em seguida, foram adicionados 225mL de caldo TSB suplementado com 20mg de Novobiocina seguindo-se de incubação a 42°C por 24h. Após, foi realizada a extração de DNA e amplificação dos fragmentos de DNA conforme descrito no item 2.2.



2.4.3 Análises físico-químicas

A atividade de água das amostras de salame foi verificada com medidor de atividade de água (modelo Aqualab 4TE, marca Decagon) e o valor de pH foi determinado com pHmetro (modelo DM-21, marca Digimed) com eletrodo tipo penetração. As análises foram realizadas em triplicata de amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do limite de sensibilidade da detecção de *E. coli* O157:H7 por RT-PCR

O primer 16S rRNA apresentou coerência de resultados entre as amostras do microrganismo nos caldos e os salames artificialmente inoculados nos ensaios 1 e 2, os quais apresentaram valores de Ct entre 15,11 e 15,78 para as amostras D1 e A1, respectivamente (Figura 1 e Tabela 5). A reprodutibilidade e o multiplex com diferentes ensaios (*stx* e *eae* ou *fliCH7*) não afetaram a reação do primer 16S rRNA, entretanto a amostra D5 apresentou uma redução no número de Ct, indicando uma possível interferência na amplificação devido a baixa concentração de inóculo (1 log UFC/g). Este resultado indica que o limite de detecção considerado do primer 16S rRNA é 1 log UFC/g.

O primer *eae* apresentou resultados próximos de Ct para as amostras D1 e A1, sendo eles 19,24 e 15,65, respectivamente (Figura 1 e Tabela 5). A reprodutibilidade e o multiplex com diferentes ensaios (16S rRNA e *stx*) não afetaram a reação do primer *eae*. As amostras de salame A1, A2, A3 e A4 apresentaram valores de Ct inferiores aos encontrados nas amostras D1, D2, D3, D4, D5 e A5. Este fato indica uma possível interferência na reação de PCR devido a presença de compostos com potencial de inibição no salame. O elevado teor de gordura presente em salames pode interferir nas reações de PCR, sendo necessário o uso de agentes surfactantes, como dimetilsulfóxido (DMSO) e tween, que em determinadas concentrações e condições podem melhorar a especificidade da reação. Mesmo com um possível interferente, todas as amostras amplificaram o primer *eae*. Este resultado indica que o limite de detecção considerado do primer *eae* é 1 log UFC/g.

O primer *stx* apresentou resultados próximos de Ct para as amostras D1 e A1, sendo eles 24,78 e 19,94, respectivamente (Figura 1 e Tabela 5). A reprodutibilidade e o multiplex com diferentes ensaios (16S rRNA e *eae*) não afetaram a reação do primer *stx*. As amostras de diluição D4 e D5 não apresentaram a amplificação do gene *stx*, sugerindo que o limite de detecção do primer considerado é de 3 log UFC/g. Entretanto, as amostras A4 e A5, que foram submetidas ao pré-enriquecimento com incubação a 42°C por 24h, apresentaram a amplificação do primer. Este resultado indica que a detecção direta, sem o pré-enriquecimento do alimento, não pode ser realizada nas condições deste método, exceto se houver a aplicação de alguma ferramenta que reduza o limite de detecção da reação. Neste caso, se for necessária a detecção deste patógeno em concentrações inferiores a 3 log UFC/g em amostras de alimento não pré-enriquecidas, sugere-se o uso de técnicas

como imunoseparação magnética como uma alternativa viável para melhorar a sensibilidade do método. O primer *stx* também apresentou valores baixos de Ct quando comparados os valores das amostras em caldo e no salame. Este resultado indica uma possível interferência na reação pela presença de compostos com potencial de inibição no salame. Assim como discutido no caso do primer *eae*, a aplicação de surfactantes pode elevar a especificidade da reação.

O primer *flicH7* apresentou resultados próximos de Ct para as amostras D1 e A1, sendo eles 21,00 e 19,37, respectivamente (Figura 2 e Tabela 5). A reprodutibilidade e o multiplex com o primer 16S rRNA não afetaram a reação do primer *flicH7*. Os valores de Ct das amostras de salame (A1 a A5) foram inferiores quando comparados aos das amostras em caldo (D1 a D5), o que indica uma possível interferência na reação pela presença de compostos com potencial de inibição no salame. Mesmo sob a ação de um possível interferente, todas as amostras amplificaram o primer *flicH7*, podendo-se considerar que o limite de detecção seja de 1 log UFC/g.

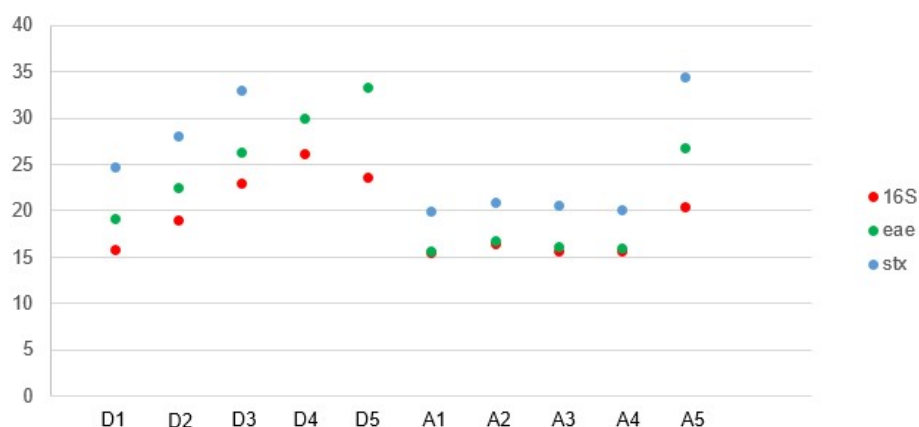


Figura 1. Ct médio dos ensaios 16S rRNA, *eae* e *stx* para as diluições de 10^{-1} a 10^{-5} do cultivo bacteriano em meio de cultura (D1-D5) e no salame (A1-A5) (reação 1).

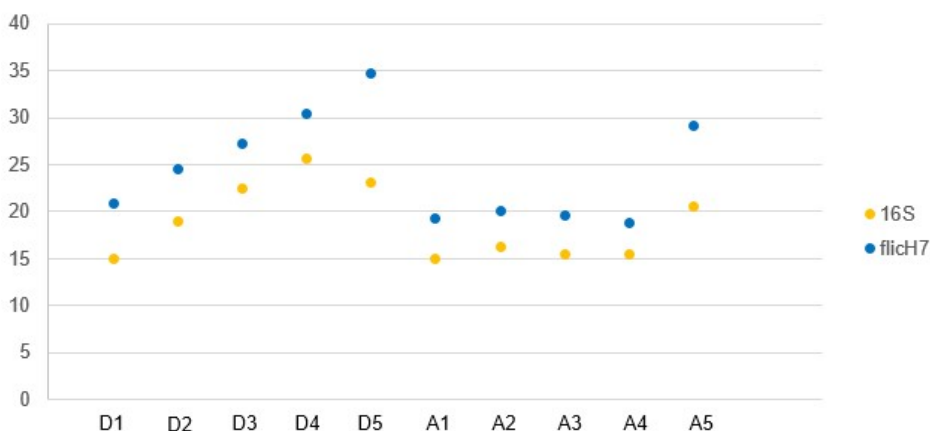


Figura 2. Ct médio dos ensaios 16S rRNA e *flicH7* para as diluições de 10^{-1} a 10^{-5} do cultivo bacteriano em caldo (D1-D5) e no salame (A1-A5) (reação 2).



Tabela 5. Valores médios de Ct obtidos na avaliação do limite de sensibilidade de RT-PCR para detecção de *E. coli* O157:H7.

Diluição	Alvo	Ct médio	DP	Salame	Alvo2	Ct médio	DP
D1	16S_reação1	15,78	0,11	A1	16S_reação1	15,59	0,29
D1	16S_reação2	15,13	0,13	A1	16S_reação2	15,11	0,32
D1	stx	24,78	0,95	A1	stx	19,94	0,21
D1	eae	19,24	0,16	A1	eae	15,65	0,08
D1	fliCH7	21,00	0,42	A1	fliCH7	19,37	0,94
D2	16S_reação1	19,00	0,09	A2	16S_reação1	16,55	0,25
D2	16S_reação2	18,98	0,05	A2	16S_reação2	16,27	0,06
D2	stx	28,15	0,35	A2	stx	20,92	0,16
D2	eae	22,60	0,2	A2	eae	16,86	0,14
D2	fliCH7	24,61	0,48	A2	fliCH7	20,11	0,24
D3	16S_reação1	23,05	0,08	A3	16S_reação1	15,69	0,11
D3	16S_reação2	22,55	0,45	A3	16S_reação2	15,58	0,72
D3	stx	32,97	0,41	A3	stx	20,63	0,3
D3	eae	26,28	0,02	A3	eae	16,21	0,15
D3	fliCH7	27,27	1,35	A3	fliCH7	19,72	1,16
D4	16S_reação1	26,23	0,36	A4	16S_reação1	15,70	0,09
D4	16S_reação2	25,79	0,16	A4	16S_reação2	15,51	0,09
D4	stx	ND	ND	A4	stx	20,11	0,07
D4	eae	29,98	0,49	A4	eae	16,09	0,04
D4	fliCH7	30,48	0,39	A4	fliCH7	18,87	0,98
D5	16S_reação1	23,59	0,11	A5	16S_reação1	20,41	0,44
D5	16S_reação2	23,15	0,02	A5	16S_reação2	20,67	2,71
D5	stx	ND	ND	A5	stx	34,41	0,32
D5	eae	33,41	0,14	A5	eae	26,77	0,19
D5	fliCH7	34,84	ND	A5	fliCH7	29,17	2,41
D1	16S_reação1	15,78	0,11	A1	16S_reação1	15,59	0,29

DP – Desvio padrão; ND – Não determinado

3.2 Ocorrência de *E. coli* O157:H7 em salames

As amostras de salame apresentaram valores de pH entre 4,64 e 5,24 e de atividade de água entre 0,851 e 0,901. As amostras de salame analisadas não apresentaram amplificação dos genes *eae*, *stx* e *fliCH7*, assim, é possível concluir que as amostras coletadas não apresentavam contaminação *E. coli* O157:H7. Os controles negativos não apresentaram amplificação, sendo que foi detectado sinal de fluorescência apenas na reação do controle interno VetMAX™ Xeno™, o que valida os resultados das amostras nas reações: *eae*, *stx* e *fliCH7*.



4 CONCLUSÃO

Os salames comerciais avaliados neste estudo não apresentam cepas de *E. coli* O157:H7, evidenciado pela ausência dos genes que codificam a toxina Shiga (*stx1* e *stx2*) em associação com o fator de adesão (gene *eae*) nestas amostras. Os resultados sustentam a premissa de que as condições a que essas amostras de produtos cárneos fermentados estão expostas não são favoráveis à sobrevivência e ao crescimento de *E. coli* O157:H7. Por fim, o fato desta bactéria não ter sido detectada nas amostras avaliadas não exclui a necessidade de se ampliar a amostragem deste estudo, a fim de se confirmar os resultados obtidos.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida e FAPESP (PDIP - Processo: 17/50349-0) pelo suporte financeiro recebido.

6 REFERÊNCIAS

- ANÔNIMO. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distribute dry-cured salami. **Morbid. Mortal. Weekly Rep.**, v.44, n.9, p.157-160, 1995.
- AROCHA, M.M., et al. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. **J. Food Prot.**, v.55, p.379-381, 1992.
- BAKAS, L., et al. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, v.47, n.2, p.353-361, 2013.
- BESSER, R.E., et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from fresh pressed apple cider. **JAMA**, v.269, p.2217-2220, 1993.
- BRASIL. Resolução Normativa N° 22/2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, Salaminho tipo Alemão, de salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano de Linguíça Colonial e Pepperoni.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em 19/02/2020.
- CALDORIN, M., et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **BEPA, Bol. Epidemiol. Paul.**, v.10, n.110, 2013.
- CASTRO, V.S., et al. Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* in Brazil: A Systematic Review. **Microorganisms**, v.7, p.137, 2019.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California, 1994. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.44, p.57-160, 1995.
- DUFFY, L.; GRAU, F.; VANDERLINDE, P. Acid resistance of enterohaemorrhagic and generic *Escherichia coli* associated with food-borne disease and meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v.60, p.83-89, 2000.
- GARCIA, P.M., et al. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.
- GLASS, K.A., et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, n.8, p.2513-2516, 1992.



- GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **J. Animal Sci.**, v.85, n.13, E45-E62, 2007.
- HINKENS, J.; FAITH, N.; LORANG, T.; BAILEY, P.; BUEGE, D.; KASPER, C.; LUCHANSKY, J. Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, v.59, p.1260-1266, 1996.
- LINDQVIST, R.; LINDBLAB, M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: **Compendium of Analytical Methods; Laboratory Procedures of Microbiological Analysis of Food**, Ottawa: Polyscience, v.3, 1994.
- LOPES, E.S., et al. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.**, v.83, p.1-10, 2016.
- MACHADO, L.A.P. Incidência dos genes *eaeA* e *stx1* em *Escherichia coli* isolada de carcaça suína abatida em frigoríficos comerciais na região sul do Brasil Abril 2014 disponível <https://www.univates.br/bdu/bitstream/10737/600/1/2014LuisAlbertoPereiraMachado.pdf> Acessado em 20/01/2020.
- NISSEN, H.; HOLCK, A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. **Food Microbiol.**, v.15, p.273-279, 1998.
- OLIVEIRA, K.A.M; MENDONÇA, R.C.S. Efeito da fermentação sobre a microbiota de embutidos cárneos. **Hig. Alim.**, v.18, n.123, p.12-17, 2004.
- PERELLE, S., et al. Detection by 5'-nuclease PCR of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145, and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. **Mol. Cell Probes.**, v.18, n.3, p.185-92, 2004.
- RAGHUBEER, R.V. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. **J. Food Prot.**, v.58, p.13-8, 1995.
- REISCHL, U., et al. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.7, p.2555-2565, 2002.
- TERRA, A.B.M., et al. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2014. 152p.
- TOSONI, N.F., et al. Antimicrobial activity of enterocin obtained from *Enterococcus durans* on Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Cienc. Rural**, v.49, n.9, 2019.
- USDA FSIS MLG 5C.00. Detection, isolation and identification of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. 2019. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg5.pdf?MOD=AJPERES>
- WILLIAMS, R.C., et al. Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *E. coli* O157:H7 Working Group. **CMAJ**, v.162, n.10, p.1409-13, 2000.