



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**Mariana Tavares Dias**

**“CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DA  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATOGÊNICAS  
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL”**

**PPGVS / INCQS  
FIOCRUZ  
2011**

---

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATOGÊNICAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
QUEIJO MINAS FRESCAL

Mariana Tavares Dias

Tese submetida, para obtenção do título de Doutor,  
ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância  
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz  
(INCQS/FIOCRUZ)

Orientadores: Dr. Victor Augustus Marin

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro

2011

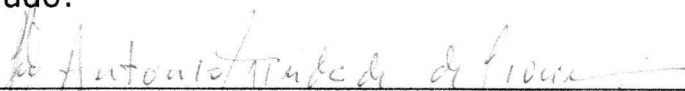
## Folha de Aprovação

"CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATOGÊNICAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL"

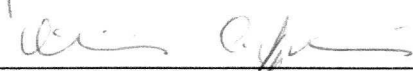
### **Mariana Tavares Dias**

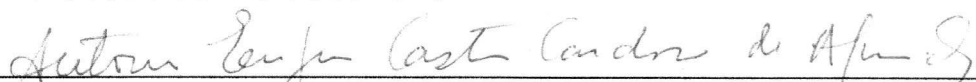
Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:



Prof. Dr. Luiz Antonio Trindade de Oliveira  
Universidade Federal Fluminense

  
Profª. Drª. Rinaldini Coralini Philipppo Tancredi  
Universidade do Rio de Janeiro

  
Prof. Dr. Antonio Eugênio Castro Cardoso de Almeida  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fiocruz

  
Orientador:

Prof. Dr. Victor Augustus Marin

  
Orientador:

Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro  
2011

Dias, Mariana Tavares

Caracterização genotípica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de cepas patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal / Mariana Tavares Dias. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

xvi, 101 f., tab., fig.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadores: Dr. Victor Augustus Marin e Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

1. *Escherichia coli*. 2. Queijo Minas Frescal. 3. Microbiologia de Alimentos. 4. Biologia Molecular. I. Título

Genotypic characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of pathogenic *E. coli* isolated from soft cheese.



*Louvado sejas, meu Senhor  
Com todas as tuas criaturas.  
Especialmente o senhor irmão Sol  
Que clareia o dia  
E com sua luz nos alumia  
E ele é belo e radiante,  
Com grande esplendor:  
De ti, Altíssimo, é a imagem.*

*Louvado sejas, meu Senhor  
Pela irmã Lua e as Estrelas  
Que no céu formastes claras  
E preciosas e belas.*

*Louvado sejas, meu Senhor  
Pelo irmão Vento.  
Pelo ar, nublado  
Ou sereno, e todo o tempo  
Pelo qual às tuas criaturas dás sustento.*

*Louvado sejas, meu Senhor  
Pela irmã Água  
Que é muito útil e humilde  
E preciosa e casta.*

*Louvado sejas, meu Senhor  
Pelo irmão Fogo  
Pelo qual iluminas a noite  
E ele é belo e jovial  
E vigoroso e forte*

*Louvado sejas, meu Senhor  
Por nossa irmã, a mãe Terra  
Que nos sustenta e governa  
E produz frutos diversos  
E coloridas flores e ervas.*

*Louvado sejas, meu Senhor  
Por me trazer até aqui,  
Que seu amor seja meu sustento e minha essência  
Louvado sejas, meu Senhor  
Por mais essa conquista!*

"Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir.  
Seja o que você quer ser, você possui apenas uma vida  
e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.  
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades  
para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E  
esperança suficiente para fazê-la feliz."

Clarice Lispector

## **Agradecimentos**

---

Agradeço a Deus, o “orientador” de toda minha vida, por ter permitido a realização desse trabalho, por se fazer presente ao longo da minha caminhada e ter me levado nos braços nos momentos difíceis, dando-me sustento para nunca desistir.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo carinho e por estar sempre a meu lado, torcendo e acreditando no meu trabalho.

Aos professores Victor Augustus Marin e Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso pela orientação, apoio, incentivos, conhecimentos transmitidos e tempo dispensado à realização desta tese.

Aos professores, membros da banca examinadora, e a tantos outros que fizeram parte da minha vida, que com seus exemplos me incentivaram e despertaram em mim a admiração pela vida acadêmica.

À EMATER-RIO, por ter possibilitado a conclusão deste estudo, e de modo especial, àqueles que, mesmo com pouco tempo de convívio, demonstraram apoio e torceram por mim. Obrigada!

Aos queridos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DM) que tanto me apoiaram, ajudaram e dividiram comigo as alegrias e tensões dos últimos quatro anos da minha vida. Obrigada por tudo, nunca vou esquecer de vocês!

Às equipes do Laboratório de Micro-organismos de Referência (DM) e do Setor de Vacina Conjugada contra H1b, pela colaboração, incentivo, ajuda e pelos amigos que fiz, que com toda gentileza e a maior boa vontade do mundo me ajudaram a chegar até aqui. Não tenho palavras para agradecer!

À equipe do Laboratório de Vacinas Bacterianas II (DI), pelo apoio com os equipamentos e aos setores de Preparação de Meios de Cultura e Esterilização de Vidrarias, pela colaboração fundamental para o bom andamento dos trabalhos, projetos e pesquisa realizados no INCQS.

Aos amigos que fiz no INCQS, e ainda, a todos que fazem parte da minha vida, que compreenderam minhas ausências, que rezaram e torceram por mim. Obrigada por terem feito com que eu me sentisse especial!

A vocês eu agradeço e desejo toda paz e todo bem!!!

**MUITO OBRIGADA!!!**

## Resumo

---

As doenças transmitidas por alimentos (DTA), causadas por micro-organismos, representam um importante problema de saúde pública, com ênfase especial aos países em desenvolvimento. O queijo Minas Frescal é um produto tipicamente nacional, de tecnologia simples e de larga aceitação no país, o que faz de sua produção uma importante atividade econômica. Diversos surtos de DTA, associados ao consumo de queijos contaminados têm sido relatados. A *Escherichia coli* (*E. coli*), é o bacilo anaeróbico facultativo predominante da microbiota intestinal de humanos e animais, encontrando-se amplamente distribuída no ambiente. De modo geral, essa bactéria é considerada um comensal inofensivo, no entanto, diversas cepas apresentam potencial patogênico. Ao menos seis categorias são descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC). Este estudo teve como objetivo isolar, avaliar a susceptibilidade antimicrobiana e caracterizar genotipicamente, as cepas patogênicas de *E. coli*, isoladas de queijo Minas Frescal comercializados na região metropolitana do Rio de Janeiro. Foram analisadas trinta amostras, sendo 22 com algum selo de Serviço de Inspeção e 8 de origem artesanal. Cinco cepas EPEC (MTD1, MTD2, MTD3, MTD4 e MTD5) foram isoladas, caracterizadas genotipicamente e confirmadas pela amplificação do gene *eae*. A avaliação da susceptibilidade antimicrobiana revelou 40% de resistência a ampicilina e 40% de perfil de resistência intermediária a associação ampicilina-sulbactam. As cepas isoladas não revelaram a presença de enzimas  $\beta$ -lactamase de amplo espectro (ESBL). O gene *eae* das cepas patogênicas foram sequenciados e depositados no GenBank/NCBI. Para realizar a tipificação genética dos isolados pela análise do "Multilocus Sequence Typing" (MLST) os genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* foram sequenciados. Três amostras (MTD1, MTD2 e MTD3) foram caracterizadas como dois novos "Sequence Type" (ST), (ST-2134 e ST-2147), não associados a nenhum complexo clonal (cc) conhecido. A amostra (MDT4) apresentou perfil compatível ao ST 48, já descrito no banco, e pertencente ao cc 10 e a amostra MTD5 foi classificada como ST-1717, ainda não associada a nenhum cc. A ocorrência de cepas patogênicas de *E. coli* associadas a este complexo clonal está descrita em animais domésticos, humanos e alimentos. Este é o primeiro estudo do Brasil a analisar cepas patogênicas *E. coli* isoladas de alimentos pela tec. MLST, e o primeiro registro do banco de dados sobre *E. coli* em queijo Minas Frescal. Tais resultados apontam um alerta para as autoridades sanitárias, visto que o queijo Minas Frescal é um alimento de pronto consumo, e, portanto, precisa ser inócua para que a saúde da população não seja colocada em risco.



## Abstract

---

Foodborne Diseases, caused by microorganisms, represents a problem of public health, especially on developing countries. The Minas soft cheese is a national product, with simple technology and high acceptance in the country, making its production an important economic activity. Several outbreaks of foodborne diseases, associated with the consumption of contaminated cheese have been reported. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the predominant anaerobic facultative bacillus of enteric microbiota from humans and animals and is widely distributed in the environment. Overall, *E. coli* is a harmless commensal, however, some strains have a pathogenic potential. At least six groups are described: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and producing diffuse adherent *E. coli* (DAEC). This study aimed to isolate, evaluate the antimicrobial susceptibility and genotypically characterize pathogenic strains of *E. coli* isolated from soft cheese commercialized in Rio de Janeiro. Thirty samples were analyzed, 22 with Inspection Service and 8 of handmade origin. Five EPEC strains (MTD1, MTD2, MTD3, and MTD4 MTD5) were identified, genotypically characterized and confirmed by *eae* gene amplification. The assessment of antimicrobial susceptibility revealed 40% resistance to ampicillin and 40% with intermediate resistance to ampicillin-sulbactam combination. The isolates were negative for broad-spectrum  $\beta$ -lactamase enzymes (ESBL). The gene *eae* of pathogenic strains were sequenced and deposited in GenBank. To perform the genetic tipification of isolates by Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis the *adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* and *recA* genes were sequenced. Three strains (MTD1, MTD2 e MTD3) were characterized with two new ST (ST-2134 and ST-2147) not associated to any known clonal complex. One strain was classified as ST-48 belonging to clonal complex 10 and one strain was classified as ST-1717, with no clonal complex association. The occurrence of pathogenic *E. coli* strains belonging to clonal complex 10 is described in domestic animals, humans and foods. This is the first study to analyse pathogenic *E. coli* strains isolated from food, by MLST, in Brazil, and the first result included in the *E. coli* MLST database of *E. coli* isolated from Minas soft cheese. These findings may represent a warning to health authorities, since this is a food product ready for consumption, posing a health risk to the population.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

---

AAF	fímbrias de aderência agregativa
<i>adk</i>	adenilato quinase
A/E	“attaching-and-effacing”
AEEC	<i>E. coli</i> produtora da lesão “attaching and effacing”
<i>agg</i>	“activator of aggregative adherence”
AM	Ampicilina
AMS	Ampicilina-Sulbactam
AOAC	“International Association of Official Analytical Chemists International”
APHA	“Americam Public Health Association”
APPCC	Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AZM	Azetreonam
BAM	“Bacteriological Analytical Manual”
<i>bfp</i>	“bundle-forming pili”
BHI	Infusão Cérebro Coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cc	complex clonal
CCS	contagem de células somáticas
CDC	“Centers for Desease Control and Prevention”
CF	fatores de colonização
CF	Cefalotina
CFA	antígeno do fator de colonização
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	“Clinical Laboratory Standards Institute”
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CS	células somáticas
DAEC	<i>E. coli</i> produtora de aderência difusa
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	“ <i>E. coli</i> attaching and effacing”

EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAF	“EPEC adherence factor”
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasivara
<i>elt</i>	“heat-labile enterotoxin”
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro estendido
<i>esc</i>	“ <i>E. coli</i> secretion”
<i>esp</i>	“EPEC secreted proteins”
<i>est</i>	“heat-stable enterotoxin”
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FAS	“Fluorescente Actin Staining”
FDA	“Food and Drug Administration”
FEP	Cefepima
<i>fliC</i>	“flagella filament protein”
FOX	Cefoxitima
<i>fumC</i>	fumarato hidratase
GD <sub>1</sub>	gangliosídeo GD <sub>1</sub>
GM	Gentamicina
GM <sub>1</sub>	gangliosídeo GM <sub>1</sub>
<i>gyrB</i>	DNA girase
HEp-2 / HeLa	células epiteliais humanas
HUS	“hemolytic uremic syndrome”
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>icd</i>	isocitrato/isopropilmalato desidrogenase
ICMSF	“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
IDF	“International Dairy Federation”
IDV	Injeção Direta de Vapor
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IMI	Imipenem
<i>ipa</i>	“invasion plasmid antigen”
ISO	“International Organization for Standardization”
Kb	Kilobase

kDa	Kilo-Dalton
LA	“localized adherence”
LAL	“localized adherence-like”
LEE	“Locus Enterocyte Effacement”
L-EMB	“Eosin Methylene Blue Agar, Levine”
LT	enterotoxina termolábil
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MC	MacConkey
mcg/mL	Micrograma/mililitro
MDa	Mega-Dalton
MDA	Ministério do Desenvolvimento Agrário
<i>mdh</i>	malato desidrogenase
MEM	Meropenem
MIC	Concentrações Inibitória Mínimas
MLEE	“Multilocus Enzyme Electrophoresis”
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
mM	milimolar
$\mu$ M	micromolar
MS	Ministério da Saúde
MUG	Metil-Umbeliferona Galactopiranosídeo
NA	Amicacina
ng	nanograma
NOB	Normas Operacionais Básicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAA	plasmídeo de adesão agregativa
pb	pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PCR-RFLP	“PCR-restriction fragment length polymorphism”
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol/ $\mu$ L	Picomol/microlitro
PPHO	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
Pronaf	Plano Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar
<i>purA</i>	Adenilosuccinatodesidrogenase
<i>recA</i>	Proteína de ligação do DNA

RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Acido Ribonucleico
<i>sep</i>	“secretion of <i>E. coli</i> proteins”
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Sulfeto-Indol-Motilidade
ST	enterotoxina termoestável
ST	“Sequence Types”
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
<i>stx</i>	toxina Shiga
STX	Trimetoprim-Sulfa
SUS	Sistema Único de Saúde
TAX	Cefotaxima
TAZ	Ceftazidima
<i>tir</i>	“Translocated intimin receptor”
TP	Triptona Fosfato
TSA	Agar Triptose Soja
TSB	“Trypticase Soy Broth”
TTP	“thrombotic thrombocytopaenic púrpura”
TZP	Piperacilina-Tazobactam
U	Unidade
UCC	“University College Cork”
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPEC	<i>E.coli</i> uropatogênica
VBP	Valor Bruto da Produção
VM	Vermelho de metila
VP	Voges-Proskauer
VT	verocitotoxina
VETEC	<i>E. coli</i> verocitoxigênica

## **Lista de Ilustrações**

---

<b>FIGURA 1:</b> Isolamento de <i>E.coli</i> patogênica em amostras de queijo Minas Frescal	<b>38</b>
<b>FIGURA 2:</b> Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana das cepas patogênicas isoladas pelo sistema VITEK_32 – GNS (BioMerieux)	<b>39</b>
<b>FIGURA 3:</b> Teste de Motilidade das cepas patogênicas isoladas	<b>40</b>
<b>FIGURA 4:</b> Extração do DNA “pool” e individual	<b>41</b>
<b>FIGURA 5:</b> Visualização da amplificação pela M-PCR das cepas de <i>E. coli</i> patogênica utilizadas como controle positivo	<b>49</b>
<b>FIGURA 6:</b> Visualização da amplificação pela M-PCR dos “pools” de 10 colônias para triagem inicial, sugerindo a amplificação do gene <i>eae</i>	<b>50</b>
<b>FIGURA 7:</b> Visualização da amplificação pela simplex PCR das cepas individuais exibindo a amplificação apenas do gene suspeito ( <i>eae</i> )	<b>51</b>
<b>FIGURA 8:</b> Visualização da amplificação pela PCR dos genes <i>adk</i> e <i>fumC</i>	<b>54</b>
<b>FIGURA 9:</b> Visualização da amplificação pela PCR dos genes <i>gyrB</i> e <i>mdh</i>	<b>54</b>
<b>FIGURA 10:</b> Visualização da amplificação pela PCR dos genes <i>icd</i> e <i>purA</i>	<b>55</b>
<b>FIGURA 11:</b> Visualização da amplificação pela PCR do gene <i>recA</i>	<b>55</b>
<b>FIGURA 12:</b> Dendograma das cepas de <i>E.coli</i> , isoladas de alimentos, depositadas no banco de dados MLST ( <a href="http://mlst.ucc.ie/mlst/">http://mlst.ucc.ie/mlst/</a> ).	<b>65</b>
<b>TABELA 1:</b> Genes, “primers” e sequências utilizados na Multiplex PCR	<b>43</b>
<b>TABELA 2:</b> Genes, “Primers” e sequências utilizados na PCR-MLST	<b>45</b>

<b>TABELA 3:</b> Visualização dos resultados da análise da susceptibilidade antimicrobiana, presença de ESBL e teste de motilidade das EPEC isoladas	<b>48</b>
<b>TABELA 4:</b> Alinhamento das sequências dos genes <i>eae</i> , identificados a partir das amostras de queijo Minas Frescal, com as sequências anteriormente despositadas no GenBank/NCBI	<b>52</b>
<b>TABELA 5:</b> Perfil dos alelos, ST e cc, obtidos após o sequenciamento dos genes preconizados no MLST, das cepas EPEC isoladas	<b>57</b>

## Sumário

---

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Doenças Transmitidas por Alimentos e Saúde Pública	1
1.2 Grupo coliforme	4
1.3 <i>Escherichia coli</i>	5
1.3.1 Fatores de virulência e patogenicidade bacteriana	6
1.3.2 <i>E. coli</i> : cepas patogênicas	7
1.3.3 Resistência Antimicrobiana	20
1.4 Alimentação Saudável X Produtos Lácteos	21
1.4.1 Queijo Minas Frescal	21
1.5 <i>E. coli</i> associada à DTA	27
1.6 Isolamento, Detecção e Tipificação do Agente Etiológico	30
1.6.1 Métodos Convencionais	30
1.6.2 Métodos Moleculares	31
1.6.3. Considerações complementares	34
<b>2. Objetivos</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>36</b>
3.1 Obtenção das amostras	36
3.2 Isolamento das cepas patogênicas	37
3.3 Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana	38
3.4 Teste de Motilidade	39
3.5 Extração de DNA	40
3.6 Caracterização Genotípica	41
3.6.1 Cepas de referência	42
3.6.2 Identificação das cepas patogênicas de <i>E.coli</i> pela Multiplex PCR	42
3.6.3 Caracterização genotípica por MLST	44
<b>4. Resultados</b>	<b>47</b>
4.1 Cepas patogênicas isoladas	47
4.2 Motilidade e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana	47
4.3 Caracterização Genotípica	49
4.3.1 Cepas patogênicas de <i>E. coli</i> identificadas pela Multiplex PCR	49



4.3.2 Cepas genotipicamente caracterizadas pela PCR – MLST.....	54
4.3.3 Genes “housekeeping” sequenciados.....	56
4.3.4 Análise do sequenciamento MLST.....	56
<b>5. Discussão .....</b>	<b>58</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Perspectivas .....</b>	<b>69</b>
<b>8. Considerações Finais .....</b>	<b>70</b>
<b>Referências .....</b>	<b>71</b>
<b>Apêndices .....</b>	<b>92</b>
Apêndice 1:.....	93
Apêndice 2:.....	99
Apêndice 3:.....	101

# **1. Introdução**

---

## **1.1 Doenças Transmitidas por Alimentos e Saúde Pública**

Nas últimas décadas, a alimentação tem sido motivo de preocupação em diversos países do mundo (SANDERS, 1999; CUNHA e CUNHA, 2007). Um grande desafio mundial vem sendo adequar a produção de alimentos à demanda crescente da população. Com a globalização, as mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares, ficaram mais evidentes os problemas relativos à qualidade dos alimentos (SANDERS, 1999). Autoridades do mundo inteiro vêm intensificando seus esforços para garantir a segurança alimentar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA), em especial as causadas por micro-organismos, revelam um crescente problema na saúde pública mundial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003; BEATTY et al., 2006; DEVASIA et al., 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem alertado para a necessidade de se coibir a contaminação de alimentos por agentes biológicos com potencial de causar danos à saúde (SANDERS, 1999). Países que possuem sistemas de notificação de doenças de origem alimentar têm documentado aumentos significativos na incidência de doenças causadas por micro-organismos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003).

Considerando que as DTA constituem um perigo relevante, a identificação da ocorrência de micro-organismos patogênicos nos alimentos vem sendo considerada prioridade básica no Brasil (BRASIL, 1997). Segundo a OMS, as doenças transmitidas por alimentos são definidas como doenças infecciosas ou tóxicas, causadas por agentes que penetram no organismo hospedeiro através da ingestão de alimentos. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003).

O alimento é essencial à vida e a manutenção da homeostase orgânica. Desta forma, o consumo de alimentos inócuos é crucial para que a saúde não seja colocada em risco.

A partir da Constituição da República de 1988, várias iniciativas institucionais, legais e comunitárias foram criando condições de viabilização plena do direito à saúde. Destacam-se, neste sentido, no âmbito jurídico institucional, as chamadas Leis Orgânicas da Saúde (Nº. 8.080/90 e 8.142/90), o Decreto Nº. 58398/06 (dispõe

sobre o Conselho Nacional de Saúde - CNS) (BRASIL, 2006) e as Normas Operacionais Básicas (NOB), editadas em 1991 e 1993 (BRASIL, 1996).

Com a Lei Nº. 8.080, de 19 de setembro de 1990, fica regulamentado o Sistema Único de Saúde (SUS), estabelecido pela Constituição Federal de 1988, que agrega todos os serviços estatais - das esferas Federal, Estadual e Municipal - e os serviços privados (desde que contratados ou conveniados), que é responsabilizado, ainda que sem exclusividade, pela concretização dos princípios constitucionais. Por sua vez, as NOB, a partir da avaliação do estágio de implantação e desempenho do SUS, se voltam, mais direta e imediatamente, para a definição de estratégias e movimentos táticos, que orientam a operacionalidade deste Sistema (BRASIL, 1996).

A Lei Nº 8.080/90, em seu Artigo 2º, dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde. “A saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício”. O Artigo 3º dessa mesma lei dispõe que a saúde tem como fatores determinantes e condicionantes, entre outros, a alimentação, a moradia, o saneamento básico, o meio ambiente, o trabalho, a renda, a educação, o transporte, o lazer e o acesso aos bens e serviços essenciais. Os níveis de saúde da população expressam a organização social e econômica do país (BRASIL, 1990a).

O SUS tem como parte integrante de seus objetivos, a identificação e divulgação dos fatores condicionantes e determinantes da saúde. Incluído no campo de sua atuação está a execução de ações de Vigilância Sanitária, que se define por um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e, o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990a).

Visando ainda a questão do direito pleno à proteção da saúde, destaca-se o Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990b), que em seu Capítulo IV, Seção I, Artigo 8º, dispõe que os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão riscos à saúde ou segurança dos consumidores.

Enfatizando a importância da observação das legislações vigentes, a fim de que seja oferecido ao consumidor um alimento seguro, ressalta-se o disposto pela OMS: “O acesso ao alimento seguro é um direito humano básico, pois contribui com a manutenção do estado de saúde e com o alívio da pobreza” (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002).

Pesquisadores do mundo inteiro vêm relatando a importância da qualidade microbiana dos alimentos (CUNHA e CUNHA, 2007), entretanto, tem sido difícil estimar a extensão global das DTA (TAUXE, 2002).

Gonçalves et al. (2008), citam em seu estudo, autores que apontam a ocorrência da morte de mais de 50.000 pessoas diariamente, causadas por DTA nos países em desenvolvimento. Segundo dados disponíveis, só no ano 2000, 2,1 milhões de pessoas morreram de doenças diarreicas que em sua maioria foram atribuídas à ingestão de água e alimentos contaminados (MEAD et al., 1999). Da mesma forma, dados da OMS apontam em 1998, aproximadamente 1,8 milhões de casos de morte por diarreia em crianças nos países em desenvolvimento associados às DTA (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003).

De acordo com Santana et al. (2006) o Brasil conta com poucos dados epidemiológicos a respeito destas doenças, e Levine et al. (1986), Guerrant et al. (1990) e Huilan—et al. (1991), ressaltam que quadros diarreicos representam a principal causa de mortalidade entre crianças em países em desenvolvimento.

Contudo, casos de diarreia e mortalidade infantil, principalmente, não são exclusividades das zonas economicamente menos favorecidas do planeta. Nos Estados Unidos, são registrados cerca de 76 milhões de casos de DTA por ano, resultando em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes (TAUXE, 2002). O autor informa ainda, um aumento anual de cerca de 30% nos casos de DTA nos países industrializados. Registros do “Institut de Veille Sanitaire”, na França, apontam que em um período de dois anos (1999-2000), ocorreram 1.267 surtos de DTA envolvendo 17.378 pessoas, causando 1.383 hospitalizações e 10 mortes (LE LOIR et al. 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003). Segundo Sanders (1999), no Reino Unido, ocorrem 35.000 internações hospitalares por ano para tratamento de diarreia aguda.

Segundo Carmo (2008), no período de 1999 a 2007 foram notificados no Brasil, 5.699 surtos de DTA, com 114.302 doentes e 61 óbitos. Silva (2010) relata que 12 mil casos de DTA são notificados anualmente no Brasil.

Apesar dos dados alarmantes, é importante ressaltar que a incidência de quadros de diarreia aguda determinada por ingestão de alimentos contaminados, provavelmente é subestimada (SATCER, 2000; SANTANA et al., 2006), pois apenas 10% dos pacientes adultos com diarreia procuram os serviços médicos, e destes, somente 20% são submetidos a exames laboratoriais (ACHESON, 1999).

A origem dos micro-organismos nos alimentos é muito diversa, incluindo o solo, o ar, a água, o trato intestinal do homem e dos animais, os manipuladores de alimentos, utensílios incorretamente higienizados etc. A maioria dos alimentos, e particularmente aqueles de origem animal, está sujeita a contaminação por bactérias patogênicas, sendo o manipulador, muitas vezes, um importante veículo implicado (EVANGELISTA-BARRETO e VIEIRA, 2003).

De acordo com Carmo (2008), diversos são os micro-organismos envolvidos em surtos de DTA, entretanto, destaca a expressiva participação das bactérias nos mesmos. Em seu estudo, a autora acima citada, revela que este micro-organismo esteve presente em 83,5% dos casos de DTA notificados no Brasil entre 1999 e 2007, cujo agente etiológico foi identificado. As bactérias responsáveis por determinar alterações gastrointestinais, conhecidas como enteropatogênicas, vêm sendo frequentemente associadas à DTA (FRANCO e LANDGRAF, 2004; GONÇALVES et al., 2008). Enteropatógenos pertencentes ao grupo dos coliformes representam importante papel na ocorrência de tal enfermidade, pois se encontram amplamente distribuídos no ambiente, uma vez que chegam ao mesmo através de eliminação fecal, favorecendo assim a contaminação das águas, do solo, e dos alimentos, seja por contaminação direta ou através de condições ou hábitos higiênicos e sanitários inadequados (NATARO e KAPER, 1998; SMITH et al., 2004).

## **1.2 Grupo coliforme**

Segundo Holt et al. (1994) dentro dessa classificação distinguem-se dois grupos: coliformes totais e coliformes fecais. Os coliformes totais possuem a capacidade de fermentar a lactose produzindo ácido e gás quando incubados a 35/37°C por 24 a 48 horas (HITCHINS et al., 1992). O grupo coliforme total, não identifica membros individualmente e tem menor valor interpretativo, podendo conter membros não entéricos. Os coliformes fecais se limitam a organismos que crescem

no trato gastrointestinal, que são capazes de fermentar a lactose produzindo ácido e gás à temperatura de incubação de 44,5°C +/- 0,5°C, por 24 horas (BRASIL, 2003a).

São constituintes do grupo coliforme os bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulados, oxidase negativos e capazes de se multiplicar em presença de sais biliares ou de outras substâncias com atividade de superfície, mantendo suas propriedades inalteradas. Pertencem a esse grupo os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Embora todos sejam capazes de se desenvolver no trato gastrointestinal dos seres humanos e animais de sangue quente, somente a *Escherichia coli* (*E. coli*) tem como “habitat” primário o trato intestinal (HITCHINS et al., 1992; BOURGEOIS et al., 1994).

### **1.3 *Escherichia coli***

*E. coli* foi pela primeira vez isolada em 1885, por Theodor Von Escherich, médico austríaco do final do século XIX, a partir de amostras fecais coletadas de crianças com diarreia. Em 1892, Shardingger sugeriu que este micro-organismo poderia ser usado como indicador de contaminação fecal. Estudos posteriores demonstraram que tal micro-organismo poderia ser encontrado e isolado em amostras fecais diarreicas ou não, sendo a partir de então, a *E. coli*, considerada participante da microbiota entérica normal do homem e dos animais de sangue quente (CORREA e CORREA, 1992). *E. coli* é provavelmente o organismo vivo mais estudado e conhecido, pois vem sendo utilizado como modelo para pesquisas de aspectos genéticos e fisiológicos em todo mundo. Seu genoma inteiro já é conhecido (BLATTNER et al., 1997) e sua biologia geral está bem estudada, como demonstram claramente as diferentes edições do trabalho clássico coordenado por Neidhardt et al. (1987; 1996).

*E. coli* é um membro típico da família *Enterobacteriaceae* que é constituída por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose, redutores de nitrato a nitrito e oxidase-negativos (LOGAN, 1994). Ainda como característica geral desta família, observa-se a capacidade de metabolizar uma variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. Essas propriedades metabólicas são de grande importância e extensivamente utilizadas para classificar e identificar gêneros e espécies desta família. Amostras típicas da espécie fermentam a lactose, com produção de ácido e

gás, produzem ácido a partir da glicose revelando resultado positivo na prova de vermelho de metila (VM), e não produzem acetoína através da metabolização da glicose, revelando resultado negativo para a prova de Voges-Proskauer (VP), não utilizam citrato, não produzem H<sub>2</sub>S e produzem indol a partir do triptofano (TRABULSI et al., 2004).

De modo geral, essa bactéria é considerada um comensal inofensivo, no entanto, diversos sorovares dessa espécie apresentam potencial patogênico (NATARO et al., 2006). Esse organismo, em especial, apresenta uma diversidade patogênica extraordinária compreendendo numerosos grupos e sorotipos, sendo capaz de causar infecções intestinais e extra-intestinais por diferentes mecanismos, assim como infecção do trato urinário e meningites (TRABULSI et al., 2004).

### 1.3.1 Fatores de virulência e patogenicidade bacteriana

Fatores de virulência correspondem a estruturas, produtos ou estratégias que potencializam a capacidade da bactéria causar infecção (TRABULSI et al., 2004).

A virulência bacteriana é um fenômeno multifatorial. As cepas patogênicas de *E. coli* possuem diferentes tipos de fatores de virulência que contribuem conjuntamente para potencializar sua patogenicidade. Essas cepas apresentam mecanismos patogênicos específicos, sorotipos distintos e produzem infecções e síndromes diferentes (BLANCO, et al., 2006).

A definição de mecanismos moleculares e celulares enfatizando as formas pelas quais os micro-organismos causam doença tem levado a uma nova forma de apreciação da patogênese bacteriana (FINLAY e VALLANCE, 2000).

Análises comparativas entre genomas bacterianos sequenciados (BLATTNER et al., 1997; DECKERT et al., 1998; KALMAN et al., 1999; PARKHILL et al., 2000) e o estudo da estrutura genética de numerosas bactérias (CAUGANT et al., 1981; 1983; MUSSER et al., 1986; ISTOCK et al., 1992) indicam de maneira definitiva que as bactérias não são organismos estáveis. Sugere-se que ao menos 17% dos genes de *E. coli* são de aquisição relativamente recente (LAWRENCE e OCHMAN, 1998), com uma taxa de transferência horizontal de aproximadamente 16 kb a cada milhão de anos (MARTIN, 1999).

A grande diversidade genômica da *E. coli* lhe confere uma notável plasticidade ecológica, e graças a ela, esses micro-organismos adaptam-se

rapidamente a diferentes ambientes, podendo dessa forma passar de organismo de vida livre, a comensal do trato intestinal dos animais de sangue quente e ainda a patógenos mortais para humanos e animais (SOUZA et al., 1999).

### 1.3.2 *E. coli*: cepas patogênicas

As linhagens patogênicas ou diarreio gênicas de *E. coli* são classificadas em categorias de acordo com os mecanismos de virulência que apresentam e com o conjunto de sinais e sintomas das doenças que provocam. O isolamento e identificação dessas cepas baseiam-se na presença de fatores e/ou marcadores de virulência associados a cada categoria, detectáveis através de testes fenotípicos e/ou genotípicos (NATARO e KAPER, 1998).

Essas cepas patogênicas de *E. coli* são comumente associadas a formas endêmicas de diarreia em crianças, que como já mencionado, é considerada a principal causa de mortalidade infantil em países em desenvolvimento (LEVINE et al., 1986; GUERRANT et al., 1990; HUILAN et al., 1991).

Dentre as amostras diarreio gênicas de *Escherichia coli* descritas, destacam-se ao menos seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998). Esta última, porém, ainda hoje não está claramente definida.

#### 1.3.2.1 *E. coli* Enteropatogênica

As cepas enteropatogênicas de *E. coli* representam um interesse particular no estudo da evolução da patogênese bacteriana pela estreita interação que apresentam com a célula hospedeira. Essas cepas determinam um padrão característico de lesão localizada, no qual as células bacterianas se aderem ao tecido e destroem as microvilosidades intestinais (SOUZA et al., 1999).

EPEC é considerada uma importante categoria de *E. coli* diarreio gênicas, e tem sido associada à diarreia infantil, principalmente nos países em desenvolvimento), acometendo comumente recém-nascidos e lactentes (NATARO e



KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002; CLARKE et al., 2003). Quadros diarréicos, em crianças, atribuídos à EPEC foram apontados como de grande incidência em berçários, onde a transmissão por funcionários, ou de criança para criança, pode ter sido o veículo implicado. Diversos surtos foram descritos em berçários onde o controle higiênico-sanitário diário não era rigoroso, no entanto, onde este controle é adequado, a incidência de EPEC é baixa. De toda forma, este organismo ainda é a maior causa de mortalidade infantil. Estudos apontaram alta incidência de EPEC em crianças recém desmamadas, e estes casos foram frequentemente associados ao consumo de formulações artificiais, onde a falta de acesso à água de qualidade adequada para a reconstituição do alimento desidratado pode ter sido fundamental para esta ocorrência (DUGUID et al., 1978).

Estudos atribuem à EPEC 117 milhões de casos de diarreia a cada ano nesses países. Entretanto, infecções esporádicas atribuídas a EPEC são observadas em países desenvolvidos (CLARKE et al., 2002). Alguns surtos causados por cepas EPEC e associados à transmissão de origem alimentar, foram identificados no Reino Unido. A maior parte das pessoas envolvidas era adulta (SMITH et al., 2004). Em termos de infecção no mundo, este é um dos agentes mais importantes (CLARKE et al., 2002).

A transmissão da EPEC é fecal-oral, podendo envolver a água e os alimentos (LEVINE e EDELMAN, 1984; NATARO e KAPER, 1998). Qualquer alimento exposto à contaminação fecal pode ser suspeito. Em estudos com adultos voluntários o período de incubação foi de oito a sessenta horas (HART et al., 1993) e a dose infectante de  $10^6$  células (FENG e WEAGANT, 2002), enquanto que para crianças menores de cinco anos, a dose necessária para causar a infecção parece bem menor.

EPEC é um patógeno extracelular que determina infecção através de sua ligação à superfície da célula hospedeira, seguida pela injeção de fatores de virulência no interior desta célula, através do sistema de secreção tipo III (DE VINNEY et al., 1999).

A patogenia de EPEC envolve a secreção da proteína intimina, codificada pelo gene *eae*, que determina uma lesão característica, do tipo “attaching-and-effacing” - A/E (HICKS et al., 1998; NATARO e KAPER, 1998), caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e aderência íntima entre a célula bacteriana e a membrana das células epiteliais do hospedeiro. Essa lesão pode ser observada por biopsia intestinal em humanos e animais (NATARO e KAPER, 1998).

As EPEC têm sido caracterizadas com base em seu sorotipo, sua lesão e a ausência da toxina Shiga. A presença do plasmídio EAF (“EPEC adherence factor”) não era considerada marcador de virulência das cepas EPEC, uma vez que algumas delas não o possuíam, sobretudo as cepas associadas a animais (ROCHA, 1999). O que se debatia, era se as cepas que não apresentavam o plasmídio EAF podiam ser consideradas patógenos verdadeiros (KAPER, 1996).

Finalmente em 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, uma definição consensual foi proposta: “As cepas produtoras da lesão A/E, negativas para toxina Shiga e possuidoras do plasmídio EAF são consideradas EPEC típicas, entretanto as que não possuem o plasmídio são consideradas cepas EPEC atípicas” (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002). A característica comum aos dois grupos é a capacidade de causar lesão A/E no epitélio intestinal e as principais diferenças referem-se aos sorotipos e à presença do plasmídio EAF somente nas EPEC típicas (TRABULSI et al., 2002).

Amostras de *E. coli* de origem animal, possuidoras de gene *eae* e que apresentam a capacidade de induzir a lesão A/E, são designadas como *E. coli* produtora da lesão “attaching and effacing” (AEEC) (MOON et al., 1983). China et al. (1999) e Dias et al. (2007), apontam a presença deste agente em animais sadios, o que pode representar um problema para a segurança alimentar, visto que estes animais não apresentam qualquer impedimento clínico para serem destinados a produção de carne ou leite e derivados lácteos.

AEEC pode ser transmitida para humanos através da ingestão de alimentos de origem animal contaminados, ou ainda através do contato direto com animais. Diversos estudos têm demonstrado a predominância dessa cepa em animais jovens, como relatam Fuente et al. (2002).

Bovinos, ovinos e suínos vêm tendo um destaque especial em diversos estudos, sendo incriminadas como as espécies mais envolvidas na transmissão de AEEC. Entretanto, macacos, cães, gatos, coelhos, aves e caprinos também já foram reportados como reservatórios naturais de AEEC. Almeida (2005), trabalhando com amostras AEEC de origem canina, descobriu a detecção do gene *bfp*, que codifica um pili do tipo IV denominado “bundle-forming pili” (BFP) e responsável por mediar o primeiro estágio da lesão A/E. A presença deste gene é comum em amostras de origem humana e está localizado no plasmídio EAF (STONE et al., 1996). De acordo com Almeida (2005) sua presença em amostras proveniente de cães sugere proximidade com as amostras EPEC típicas humanas.

Na presença de células epiteliais, as amostras de EPEC típicas ou clássicas determinam um padrão de aderência localizada (“localized adherence” - LA), enquanto as EPEC atípicas apresentam, em geral, um padrão de aderência que se assemelha ao padrão localizado conhecido como “localized adherence-like” (LAL) (TRABULSI et al., 2002).

Os genes que codificam a lesão A/E encontram-se juntos, formando uma ilha de patogenicidade chamada “Locus Enterocyte Effacement” (LEE). LEE foi descrita como uma região de aproximadamente 35 Kb (MC DANIEL et al., 1995; PERNA et al., 1998), responsável por codificar os fatores que caracterizam o fenótipo A/E em patógenos como EPEC, EHEC, *Citrobacter rodentium* e *Hafnia alvei* (MC DANIEL et al., 1995).

A região LEE encontra-se organizada em três domínios com funções conhecidas. Na região central, encontra-se o gene *eae*, que codifica uma proteína de membrana externa de 94 a 97 KDa, denominada intimina, responsável pela íntima aderência entre a bactéria e o enterócito (BEEBAKHEE et al., 1992; YU e KAPER, 1992). Em 1999, Higgins et al., demonstraram experimentalmente que a intimina estimulava a inflamação e a hiperplasia do intestino, favorecendo a colonização no intestino delgado.

Localizados à direita do gene *eae*, encontram-se os genes *esp* e *tir*. Os genes *esp* são responsáveis pela codificação das proteínas Esp A, Esp B e Esp D (“EPEC secreted proteins”), que induzem, na célula epitelial, uma sequência de eventos de transdução de sinais que determinam a destruição das vilosidades intestinais (FRANKEL et al., 1996). O gene *tir* codifica a proteína Tir (“Translocated intimin receptor”), de aproximadamente 90 KDa, e que após ser exportada pela EPEC para o enterócito, é fosforilada pelas proteínas quinase A e tirosina quinase, ficando exposta na superfície da célula, funcionando como receptor para a intimina (KENNY et al., 1997).

À esquerda de *eae*, *esp* e *tir* estão os genes *esc* e *sep*, que codificam um sistema de secreção tipo III, envolvidos na secreção das proteínas Esp e Tir.

As diferenças observadas em genes do locus LEE, bem como nos seus sítios de inserção, determinam alterações filogenéticas e podem representar uma especialização ou adaptação às diferentes espécies infectadas (JORES et al., 2004).

O modelo de patogênese da infecção por EPEC tem sido proposto em quatro estágios distintos (DONNENBERG e KAPER, 1992; KNUTTON et al., 1998; CLARKE et al., 2003).

O primeiro estágio é mediado pela expressão dos pili formadores de feixe, denominados BFP e codificados por genes *bfp* localizados em um plasmídio de alto peso molecular (60 megadaltons - MDa) (BALDINI et al., 1983), denominado EAF (STONE et al., 1996), pela síntese da proteína intimina e a expressão dos filamentos associados à superfície (proteínas EspA).

No segundo estágio, a EPEC adere à célula epitelial via filamentos BFP e EspA e o sistema de secreção tipo III transloca o receptor Tir e um indeterminado número de moléculas efetivadoras diretamente na célula hospedeira. Essas moléculas ativam as vias de sinalização celular, causando alterações na célula hospedeira, resultando na despolimerização da actina e perda de microvilosidade. O receptor Tir é modificado pela ação da proteína quinase A e da proteína tirosina quinase, e fica exposto na superfície do enterócito.

No terceiro estágio, os filamentos EspA são removidos da superfície da célula bacteriana hospedeira. A adesina bacteriana, intimina, liga-se ao receptor Tir modificado, resultando em uma fixação íntima entre a bactéria e a membrana da célula epitelial. Um acúmulo de actina e outros elementos do citoesqueleto celular ficam localizados sob o sítio de aderência bacteriana.

Durante o quarto estágio, o acúmulo maciço de elementos do citoesqueleto no sítio de fixação bacteriana resulta na formação de uma estrutura característica da categoria EPEC, os pedestais (formações proeminentes que alteram o aspecto da membrana celular), que sustentam a bactéria na adesão íntima com a membrana da célula epitelial. Tal estrutura pode ser facilmente observada através do teste “Fluorescente Actin Staining” (FAS), teste fenotípico descrito por Knutton et al. (1989), que pode ser usado na detecção da expressão da lesão A/E em EPEC e EHEC (KNUTTON et al., 1989, 1991; SCOTLAND et al., 1990). As moléculas efetivadoras deslocadas interrompem os processos metabólicos da célula hospedeira, resultando em perda da função mitocondrial, levando a perda de eletrólitos e eventual morte celular.

A formação da lesão A/E resulta na redução da capacidade absorptiva da mucosa intestinal, determinando um desequilíbrio hidroeletrólítico no organismo, com subsequente quadro diarréico (CLARKE et al., 2003). Os sintomas comuns da infecção se caracterizam por diarréia aquosa profusa com muco, vômito e febrícula (NATARO e KAPER, 1998).

### 1.3.2.2 *E. coli* Enterotoxigênica

Em 1973, ETEC foi identificada como causa de diarreia humana, sendo considerada no mundo inteiro, como a maior causa de diarreia associada a *E. coli* (HART et al., 1993; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). É conhecida como agente causador da “diarreia dos viajantes” e da diarreia infantil, ocorrendo comumente em países onde as condições higiênico-sanitárias são precárias (NATARO e KAPER, 1998).

ETEC normalmente não é um problema em países desenvolvidos, apesar de já ter sido relacionada a surtos de enterite infantil em hospitais e a grandes surtos devido ao consumo de água e alimentos contaminados (DANIELS et al., 2000). Nos Estados Unidos, esta categoria de *E. coli* tem sido implicada em surtos esporádicos de DTA devido à ingestão de água, queijos macios, comida mexicana e vegetais crus contaminados (FENG e WEAGANT, 2002).

Além de humanos, a diarreia aguda associada a este patógeno, acomete também animais (GUTH, 2000; UGRINOVICH et al., 2002), principalmente aqueles com poucos dias de vida e os recém desmamados, ocasionando importantes perdas econômicas nas exportações de gado bovino e suínos (BLANCO et al., 2006). As características de virulência que distinguem essa cepa são a capacidade de colonizar a superfície do intestino delgado do hospedeiro e de produzir enterotoxinas que induzem a secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal (GUTH, 2000).

Esta cepa é capaz de produzir dois tipos de enterotoxinas: uma termoestável (ST) de aproximadamente 5 KDa e uma termolábil (LT). Esta última é muito similar em tamanho (86 KDa), sequência, antigenicidade e função, se comparada com a toxina colérica. A patogenia da ETEC está relacionada à produção de fatores de colonização (CF), que são proteínas de superfície, e à produção de uma ou ambas enterotoxinas. (HART, et al., 1993; GUTH, 2000; FENG e WEAGANT, 2002)

O primeiro passo para a colonização das cepas ETEC na mucosa intestinal está associada à expressão de CF, que reconhecem receptores específicos (glicoproteínas) no epitélio intestinal. Uma grande variedade de CF é descrita em cepas ETEC e fímbrias podem ou não estar presente nessas proteínas. Muitos CF são fímbrias e consistem de um antígeno simples, como o antígeno do fator de colonização I (CFA/I), enquanto outros como o CFA/II e o CFA/IV são formados por um complexo de diferentes antígenos (GUTH, 2000).

Os genes *elt* e *est*, codificadores da síntese das enterotoxinas LT e ST respectivamente são encontrados predominantemente em plasmídios, entretanto alguns genes que codificam ST têm sido encontrados em “transposons” (NATARO e KAPER, 1998).

As ST são enterotoxinas monoméricas que contêm múltiplos resíduos de cisteína nas pontes dissulfetos, importantes para a estabilidade ao calor. Há duas classes distintas de ST, a STa (também chamada de ST-I) e STb, que diferem em estrutura e mecanismo de ação (NATARO e KAPER, 1998). Existem algumas variantes de STa, a STp (ou STIa) e STh (ou STIb). A STp ou STIa é isolada de humanos e animais, a STh ou STIb é encontrada predominantemente em humanos (NATARO e KAPER, 1998; FENG e WEAGANT, 2002). A classe STb está associada primariamente a cepas ETEC isoladas de suínos, entretanto, algumas cepas ETEC expressando STb, de origem humana, foram observadas (TRABULSI et al., 2002; KAPER et al., 2004).

As LT são enterotoxinas oligoméricas e consistem de dois sorogrupos: LT-I e LT-II. A LT-I é composta por uma subunidade A e cinco subunidades B idênticas, organizadas em um anel (NATARO e KAPER, 1998; GUTH, 2000). As subunidades B ligam-se fortemente ao receptor intestinal GM<sub>1</sub> (gangliosídeo GM<sub>1</sub>) e possibilitam a entrada da subunidade A na célula-alvo. A subunidade A (adenosina-difosfato ribosila, proteína de membrana - G<sub>s</sub>) é responsável pela atividade enzimática da toxina através da ativação da adenilato-ciclase, resultando em um aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), isto induz a uma redução na absorção de sódio pelas microvilosidades intestinais e subsequentemente ativa a secreção de cloreto, bicarbonato de potássio e água pelas criptas intestinais, resultando em diarreia osmótica tóxica (NATARO e KAPER, 1998).

A LT-II aumenta o nível intracelular de cAMP por um mecanismo similar ao que foi visto anteriormente (toxicidade da LT-I), porém o receptor utilizado pela LT-II é o GD<sub>1</sub> (gangliosídeo GD<sub>1</sub>) (FUKUTA et al., 1988).

As enterotoxinas LT-I são produzidas por amostras ETEC comumente associadas ao homem, enquanto que a LT-II tem sido detectada em amostras ETEC isoladas de alimentos e animais (NATARO e KAPER, 1998; GUTH, 2000; UGRINOVICH et al., 2002). Os genes que codificam para a síntese de LT estão em plasmídios que também podem conter genes que codificam para ST e/ou CF (NATARO e KAPER, 1998; GUTH, 2000).

A transmissão da infecção por ETEC é fecal-oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados (DANIELS et al., 2000; CLARKE, 2001). Estima-se que a dose infectante de ETEC para adultos seja aproximadamente de  $10^8$  células (FENG e WEAGANT, 2002), todavia, esta dose pode variar de acordo com o estado imune e/ou a idade do indivíduo exposto (VIBOUD et al., 1999; FENG e WEAGANT, 2002). A infecção é caracterizada por diarreia aquosa, náusea, vômito, cólicas abdominais (CLARKE, 2001) e febre baixa ou ausente (NATARO e KAPER, 1998).

### 1.3.2.3 *E. coli* produtora de toxina tipo Shiga / *E. coli* Enterohemorrágica

Há muitos sorotipos de *E. coli* produtoras de toxina tipo Shiga, mas somente aquelas que têm sido associadas clinicamente à colite hemorrágica são designadas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (FENG e WEAGANT, 2002)

As cepas EHEC são reconhecidas como a causa primária de diarreia sanguinolenta profusa (colite hemorrágica), que pode progredir para a síndrome urêmica hemolítica (“hemolytic uremic syndrome”, HUS) (NATARO e KAPER, 1998; FENG e WEAGANT, 2002; OCHOA e CLEARY, 2003). A HUS esta associada à quadros de anemia hemolítica microangiopática, insuficiência renal aguda e trombocitopenia (NATARO e KAPER, 1998; CLARKE, 2001; OCHOA e CLEARY, 2003). EHEC é caracterizada pela produção de uma potente citotoxina (verocitotoxina - VT) com atividade tóxica em células Vero, ou pela produção de toxinas tipo Shiga (Stx) que são estrutural e imunologicamente indistinguíveis daquela produzida pela *Shigella* spp. Ambas as toxinas apresentam duas subunidades: A e B (KONOWALCHUK et al., 1977; NATARO e KAPER, 1998; OCHOA e CLEARY, 2003). Por essa razão as cepas EHEC são também chamadas de *E. coli* verocitoxigênica (VTEC) ou *E. coli* produtora de toxina tipo Shiga (STEC) (OCHOA e CLEARY, 2003). Entretanto, como já citado anteriormente, somente aquelas que têm sido associadas clinicamente à colite hemorrágica são designadas como EHEC (FENG e WEAGANT, 2002).

Destas, a *E. coli* O157: H7 foi o sorotipo de EHEC mais frequentemente envolvido em casos de doenças pelo mundo (NATARO e KAPER, 1998). Nos Estados Unidos mais de 80% de infecções devido a STEC foram por cepas O157 (BANATVALA et al., 2001). Muitos casos de HUS foram associados com a *E. coli* O157: H7 nos Estados Unidos e Canadá, apesar de outros sorotipos STEC também

causarem esta síndrome (OCHOA e CLEARY, 2003). Baker et al. (1999), observaram uma alta incidência de VTEC O157 na Nova Zelândia, com impacto relativamente alto da doença, que apresentou taxa de hospitalização de 41% e letalidade de 2,6%. O mesmo sorogrupo foi relatado ainda como um problema emergente de saúde pública no Reino Unido (SMITH et al., 2004).

VTEC O157 e cepas pertencentes a outros sorogrupos foram associadas à diarreia branda, diarreia sanguinolenta severa e HUS, sendo essa, considerada a causa mais comum de insuficiência renal em crianças no Reino Unido (SMITH et al., 2004). As EHEC não O157 variam geograficamente em importância. Na Áustria e Alemanha estas cepas foram associadas a 43% dos pacientes com HUS positivos para STEC (GERBER et al., 2002).

*E. coli* O157: H7 foi considerada rara na Austrália e cepas O111 foram os tipos mais comuns de STEC (ELLIOTT et al., 2001). Cantarelli et al. (2000), descreveram o isolamento de uma cepa de STEC O91: H21 associada ao quadro diarreico de uma criança na cidade de Porto Alegre - RS, Brasil. Esses autores sugeriram melhores avaliações destas cepas na população.

Uma baixa dose infectante foi estimada em investigações de surtos de EHEC (NATARO e KAPER, 1998). A dose infectante para a *E. coli* O157: H7 está estimada entre 10 e 100 células, o que facilita muito a propagação da infecção (FENG e WEAGANT, 2002). A via de transmissão das infecções por EHEC é fecal-oral, e se dá através de pessoa a pessoa e de água e alimentos contaminados, principalmente alimentos de origem bovina, além de brotos de alfafa, alface, salame, leite e sucos não pasteurizados (RILEY et al., 1983; GRIFFIN e TAUXE, 1991; SWERDLOW et al., 1992; BUCHANAN e DOYLE, 1997; BAKER et al., 1999; HILBORN et al., 1999; SMITH et al., 2004). O período de incubação varia normalmente de um a seis dias, entretanto pode chegar a 14 dias (CLARKE, 2001).

O mecanismo de patogenicidade proposto para as cepas EHEC consiste na ocupação dos receptores glicolipídicos Gb<sub>3</sub> das células pelas subunidades B das toxinas, possibilitando a internalização destas toxinas, subsequentemente, as subunidades A provocam a diminuição da atividade enzimática das células hospedeiras, levando a inibição da síntese protéica resultando em apoptose (morte celular) (BUCHANAN e DOYLE, 1997; NATARO e KAPER, 1998; OCHOA e CLEARY, 2003).

Stx é uma potente citotoxina que possui pelo menos dois importantes grupos: Stx1 e Stx2, codificadas pelos genes *stx1* e *stx2* respectivamente. Existem muitas



variantes de Stx2 (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f). Algumas cepas de STEC produzem somente Stx1, outras produzem somente Stx2 (ou variantes desta), enquanto outras cepas de STEC produzem ambas as toxinas, no entanto, são poucas as cepas de STEC que são capazes de produzir três variantes de Stx2 (BERTIN et al., 2001; OCHOA e CLEARY, 2003). Tipicamente as cepas EHEC que causam doenças em humanos também possuem genes que auxiliam na colonização intestinal, via lesão “attaching-and-effacing”, mediada pela proteína intimina (FRIEDRICH et al., 2002). As cepas EHEC têm o mesmo mecanismo de adesão e a mesma ilha de patogenicidade das EPEC (NATARO e KAPER, 1998).

Os sintomas clínicos iniciais da infecção incluem dor abdominal severa, vômito e diarreia aquosa, que se torna hemorrágica na maioria dos pacientes, e o quadro febril é baixo ou ausente (BUCHANAN e DOYLE, 1997; CLARKE, 2001; OCHOA e CLEARY, 2003). A infecção por *E. coli* O157: H7 pode desencadear um quadro de púrpura trombocitopênica trombótica (“thrombotic thrombocytopenic púrpura” - TTP), que se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, alterações do sistema nervoso central, insuficiência renal e febre (PICKERING et al., 1994; BOYCE et al., 1995; BUCHANAN e DOYLE, 1997).

O trato gastrointestinal de animais de produção como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e frangos, foi identificado como um importante reservatório de EHEC (GRIFFIN e TAUXE, 1991; BEUTIN et al., 1993; WANG et al., 1996; BLANCO et al., 1997; MOREIRA et al., 2003). Cerqueira et al. (1999), descreveram que STEC esteve largamente distribuída em amostras fecais de bovinos saudáveis, tanto no gado de corte como no gado leiteiro, provenientes de áreas rurais do estado do Rio de Janeiro. Wang et al. (1996), constataram que a *E. coli* O157: H7 pôde sobreviver em fezes bovinas por um longo período e permanecer com a sua habilidade de produzir verocitotoxinas. Outras investigações indicaram que este patógeno poderia permanecer viável na água por um longo período e a água pode também ser repetidamente contaminada por fontes não conhecidas (SWERDLOW et al., 1992). A contaminação de alimentos pelas fezes de bovinos é uma rota provável de transmissão de *E. coli* O157: H7 para humanos (WANG et al., 1996).

#### 1.3.2.4 *E. coli* Enteroagregativa

EAEC é um subgrupo de *E. coli* diarreiogênica que, durante a última década tem recebido atenção especial por estar associada a casos de diarreia aquosa e frequentemente persistente (WEINTRAUB, 2007).

Com o desenvolvimento do ensaio de aderência, *in vitro*, em células epiteliais humanas (HEp-2 ou HeLa), foi descoberto que certas cepas *E. coli* não-EPEC demonstraram um padrão agregativo de adesão (dispondo-se como uma “pilha de tijolos”), estas cepas foram mais tarde, reconhecidas como uma categoria de *E. coli* diarreiogênica (CZECZULIN et al., 1999; HUANG et al., 2004).

A importância desta cepa em Saúde Pública está aumentando, visto que cresce o número de estudos que sustenta a associação desta cepa com diarreia em populações de países em desenvolvimento, sendo considerado um patógeno emergente (NATARO e KAPER, 1998; CZECZULIN et al., 1999; HUANG et al., 2004). EAEC ganhou rapidamente reconhecimento como um importante patógeno entérico, afetando crianças e adultos, tanto de países em desenvolvimento quanto de países desenvolvidos (ITOH et al., 1997; JIANG et al., 2002; HUANG et al., 2004; SMITH et al., 2004).

Alguns surtos indicaram que a EAEC foi a causa de DTA em países industrializados (NATARO et al., 1998; NATARO e KAPER, 1998). No estudo de Itoh et al. (1997) foi descrita a ocorrência de um grande surto de diarreia devido a EAEC no Japão, envolvendo 16 diferentes escolas e um total de 2.697 crianças que contraíram a enfermidade depois de consumir lanches escolares contaminados. Um estudo com voluntários demonstrou que a ingestão de  $10^{10}$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de EAEC provocou diarreia (NATARO et al., 1995), entretanto, a dose infectante ainda é desconhecida (HUANG et al., 2004). A EAEC está associada à diarreia persistente ( $\geq 14$  dias) (NATARO e KAPER, 1998; NATARO et al., 1998; CERNA et al., 2003; HUANG e DuPONT, 2004).

Este grupo de *E. coli*, de acordo com Adachi et al. (2001), é a segunda causa mais comum da chamada “diarreia dos viajantes” em várias áreas do mundo, sendo nestas regiões, tão importante quanto a ETEC. As cepas EAEC podem ser encontradas em alimentos provenientes de áreas onde a infecção é endêmica, e nestas mesmas áreas a infecção assintomática ocorre comumente (ADACHI et al., 2002a). Portanto, a enfermidade ocasionada por este patógeno, provavelmente, é de origem alimentar e os fatores de risco para o desenvolvimento da infecção incluem:

refrigeração imprópria, falta de higiene e contaminação dos alimentos (ADACHI et al., 2002b; HUANG et al., 2004). Outros fatores possíveis de risco incluem imunossupressão, tal como infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (DURRER et al., 2000; HUANG et al., 2004; HUANG e DuPONT, 2004).

O maior obstáculo na identificação do mecanismo de patogênese da EAEC é a diversidade e heterogeneidade das cepas (HUANG et al., 2004). Estudos da patogênese deste grupo sugerem a presença de três estágios (NATARO et al., 1998).

O primeiro consiste na aderência da EAEC à mucosa intestinal por meio de fímbrias de aderência agregativa do tipo I e II (AAF I/II), codificadas pelos genes de virulência *aggA* e *aggfA*, respectivamente. Estes genes estão presentes em regiões distintas de um plasmídeo de 60 MDa, conhecido como pAA (plasmídeo de adesão agregativa). Uma destas regiões codifica, entre outras proteínas, um ativador transcricional dos genes de virulência, denominado AggR (HUANG et al., 2004).

Bernier et al. (2002) identificaram uma AAF tipo III em uma cepa EAEC típica (55989), sendo esta fímbria codificada pelos genes *agg-3A* e *agg-3C*.

O segundo passo está relacionado ao aumento da produção de muco, provenientes da bactéria e da célula hospedeira, onde este é depositado como uma camada incrustada com a bactéria na superfície dos enterócitos (HUANG et al., 2004).

No estágio final da patogênese da EAEC ocorre uma resposta inflamatória com liberação de citocina, gerando aumento na secreção de fluido intestinal (JIANG et al., 2002).

O período de incubação da enfermidade varia de 8 a 18 horas. As características clínicas comuns da infecção por EAEC incluem diarreia aquosa com presença ou ausência de sangue e muco nas fezes, dor abdominal, náusea, vômito e febrícula (HUANG et al., 2004). Como mencionado, este grupo de *E. coli* causa com frequência quadros diarréicos persistentes.

#### 1.3.2.5 *E. coli* Enteroinvasiva

Diferente da *E. coli* típica, a EIEC é imóvel, não fermenta a lactose (ou fermenta tardiamente) e não descarboxila a lisina (SILVA et al., 1980; FENG e

WEAGANT, 2002). Este grupo é genética, bioquímica e patogenicamente semelhante à *Shigella* spp. (NATARO e KAPER, 1998; LAN et al., 2004).

O reservatório desta categoria de *E. coli* é o próprio ser humano (FENG e WEAGANT, 2002). A EIEC é causa significativa de mortalidade em crianças de países desenvolvidos, apesar de a maior parte dos enteropatógenos ser mais importante nos países em desenvolvimento, onde, de um modo geral, as condições de saneamento e os níveis de higiene são mais precários (CLARKE, 2001).

A transmissão é por contato pessoal e ingestão de água e alimentos contaminados (HARRIS et al., 1985; GORDILLO et al., 1992). Smith et al. (2004) relataram surtos DTA na cidade de Yorkshire (Reino Unido), onde isolados de *E. coli* O124, um típico sorogrupo enteroinvasivo, foi obtido de restaurantes e de dois manipuladores de alimentos desta região.

Estudos com voluntários demonstraram que pelo menos  $10^6$  células são necessárias para provocar doença em adultos saudáveis (FENG e WEAGANT, 2002). Sua patogenicidade deve-se à capacidade de invadir e causar inflamação e necrose na mucosa do cólon (SANSONETTI, 1992; NATARO e KAPER, 1998; FENG e WEAGANT, 2002). Semelhante a *Shigella* spp., a EIEC elabora uma ou mais enterotoxinas que pode ocasionar diarreia (NATARO e KAPER, 1998). O modelo da patogênese deste grupo, segundo Sansonetti (1992) e Goldberg e Sansonetti (1993), compreende: penetração na célula epitelial; lise do vacúolo endocítico; multiplicação intracelular; movimento direcional do citoplasma e extensão em direção as células epiteliais adjacentes.

Quando a infecção é severa, esta sequência de eventos induz uma forte reação inflamatória, determinando ulcerações na mucosa do cólon (SANSONETTI, 1992; NATARO e KAPER, 1998). O gene *ipaH*, que determina o mecanismo de invasão é codificado por um plasmídio de alto peso molecular de aproximadamente 120-140 MDa (HART et al., 1993; FENG e WEAGANT, 2002).

As infecções causadas pelas cepas enteroinvasivas se caracterizam clinicamente por diarreia profusa, podendo ter sangue e muco nas fezes (NATARO e KAPER, 1998; CLARKE, 2001), associadas ainda a cólicas abdominais, febre, arrepios, cefaléia e mialgia (GERMANO e GERNMANO, 2001).

### 1.3.3 Resistência Antimicrobiana

Grande parte das infecções determinadas por cepas patogênicas de *E. coli* são debeladas espontaneamente pelo organismo, entretanto, em alguns casos faz-se necessário o estabelecimento de medidas terapêuticas, muitas vezes lançando mão de antimicrobianos.

O uso de antimicrobianos foi revolucionário no tratamento das infecções bacterianas e crucial para a redução da mortalidade (NATARO e KAPER, 1998). Entretanto, seu uso abusivo e indiscriminado, tanto em humanos (CHUC et al., 2002) quanto na medicina veterinária (COSTA et al., 2006), pode ter contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana (CHUC et al., 2002).

Para estimar a extensão do problema da resistência antimicrobiana e acompanhar essa evolução, programas de vigilância têm sido estabelecidos em diversos países ao redor do mundo, incluindo o “National Antimicrobial Resistance Monitoring System” (NARMS) nos Estados Unidos (TOLLEFSON et al., 2003) e o “Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance”, no Canadá (ANONYMOUS, 2004). Sader et al. (2004) aponta que muitos programas de vigilância da resistência antimicrobiana tem sido implementados na América do Norte e na Europa, e poucos são os dados referentes a esta resistência em países da América Latina. O “Antimicrobial Surveillance Program” (SENTRY), iniciado em 1997, representa o mais completo programa de vigilância destes países. O Programa SENTRY coleta isolados de infecções clinicamente documentadas em mais de 80 centros médicos em todo o mundo, sendo dez na América Latina.

A maioria desses programas dedica-se a vigilância dessa resistência em agentes determinantes de zoonoses e em indicadores bacterianos da microbiota normal dos animais (*E. coli* e *Enterococcus* spp.). Isso representa um importante primeiro passo nos esforços para entender e controlar a resistência aos antimicrobianos (CHOPRA e ROBERTS, 2001; SHAW, et al., 1993; SKO“LD, 2001).

Segundo a OMS, mudanças na população microbiana podem levar à evolução de micro-organismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de virulência em antigos patógenos, desenvolvendo resistência a antimicrobianos ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003). Frequentes casos de cepas diarreio gênicas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos, têm sido descritos (VAN

DEN BOGAARD et al., 2001; SCHROEDER et al., 2002; COSTA et al., 2006), além da observação de cepas multi-resistentes (KRUMPERMAN et al., 1983).

A avaliação da diversidade e distribuição dos genes de resistência nas populações bacterianas pode representar uma poderosa ferramenta para entender a epidemiologia da resistência antimicrobiana (BOERLIN, 2004).

## **1.4 Alimentação Saudável X Produtos Lácteos**

A busca por alimentos saudáveis, por uma melhor qualidade de vida e por uma dieta mais adequada vem revelando ao cenário mundial um aumento no consumo de leite e derivados lácteos, ao lado de uma crescente preocupação quanto à qualidade desses alimentos (SILVA e SOUZA, 2006). Profissionais de saúde vêm recomendando o consumo destes alimentos como base de uma alimentação balanceada (INMETRO, 2009).

No Brasil a indústria de laticínios é expressiva. No período de 2002 a 2008, a produção nacional de leite passou de 21,6 para 27,5 bilhões de litros, correspondentes a variação de 27,43% e a taxa média de crescimento de 4,12% ao ano (IBGE, 2010), e de acordo com Barros et al. (2004), em 2002 o Brasil produziu 31.762 toneladas de queijo Minas Frescal.

### **1.4.1 Queijo Minas Frescal**

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997), entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo semigordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida neste regulamento. Além disso, apresenta baixo pH (5,1-5,6) e 1,6% de NaCl (FREITAS et al., 1993).

O queijo tipo Minas Frescal é um produto tipicamente nacional, de tecnologia simples e de larga aceitação no país, entretanto, devido ao comprometimento da sua

qualidade, pesquisadores de diferentes partes do mundo têm voltado seus olhos para a importância da qualidade sanitária deste produto (SILVA e SOUZA, 2006).

Visando evitar riscos à saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da Resolução da Diretoria Colegiada N° 12 de 02 de janeiro de 2001 (RDC N°12) (BRASIL, 2001) estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Para queijos de muito alta umidade (55%) incluindo os queijos Minas Frescal, devem ser quantificados os seguintes micro-organismos: Coliformes a 45°C ( $5 \times 10^2/g$ ), Estafilococos coagulase positiva ( $5 \times 10^2/g$ ), *Salmonella* spp. (ausência em 25 g) e *Listeria monocytogenes* (ausência em 25 g). O item 5.9 desta resolução determina as considerações sobre os grupos de micro-organismos pesquisados, e o item subsequente 5.9.1. dispõe que a denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes" e que caso seja determinada a presença de *E. coli*, isto deve constar no laudo analítico.

No anexo II, desta mesma resolução, que se refere à conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano, o item 1.2 trata da interpretação dos resultados dos produtos em condições sanitárias insatisfatórias e descrevem duas condições para que os produtos sejam assim classificados:

- 1.2.1. São aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa.
- 1.2.2. São aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros micro-organismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor.

O Ministério da Saúde (MS) e o MAPA vêm unindo esforços para que os produtos oferecidos ao consumidor apresentem boas condições sanitárias, e para tanto, ressalta-se a importância do atendimento aos requisitos das legislações vigentes, como a RDC N°12, (BRASIL, 2001), a Instrução Normativa N°51 (BRASIL, 2002) e o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1974).

A partir de setembro de 2002, com a instituição da Instrução Normativa N°51, a legislação brasileira passou a utilizar a contagem de células somáticas (CCS) como mais um critério de qualidade e aceitação do leite (BRASIL, 2002).

Esta Instrução Normativa estabelece limites máximos para a quantificação destas células somáticas (CS), que devem ir diminuindo gradativamente, de acordo

com a região do país, e num período de sete anos (até 2012) devem atingir o patamar de  $4 \times 10^5$  CS/mL, como já praticado na União Européia. A contagem máxima de  $7,5 \times 10^5$  CS/mL para o leite “in natura” refrigerado esta em vigor desde 01/07/2008 até 01/07/2011 para as regiões sul, sudeste e centro-oeste, e no periodo de 01/07/2010 a 01/07/2012 para norte e nordeste (BRASIL, 2002).

A CCS que deve ser realizada com periodicidade mínima mensal e expressa em células somáticas/ mililitro (CS/mL), tem sido utilizada como importante indicador da sanidade da glândula mamária e da qualidade do leite (O'BRIEN et al., 2001). As CS estão presentes normalmente no leite e são representadas por leucócitos, neutrófilos e células de descamação do epitélio secretor da glândula mamária.

Segundo Kitchen (1981), um dos principais fatores relacionados à diminuição da qualidade do leite destinado a industrialização e ao consumo humano é a mastite, doença que frequentemente acomete os rebanhos leiteiros, e se caracteriza pela inflamação das glândulas mamárias das fêmeas em lactação e que determina um aumento significativo de CS no leite. Com isso, a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, o rendimento e a qualidade dos derivados lácteos são influenciados negativamente. Este leite, portanto, deve ser descartado.

Entretanto, ainda outros critérios de qualidade, além da CCS, devem ser observados para que o leite e seus derivados não representem um risco para a saúde, como por exemplo, a submissão do leite ao processo de pasteurização.

Entende-se por pasteurização o “emprego conveniente do calor com o fim de destruir a microbiota patogênica presente no alimento, sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio do leite, e sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos e de suas propriedades organolépticas normais” (BRASIL, 1974). Ainda de acordo com a legislação citada, são permitidos dois tipos de pasteurização: pasteurização lenta, que consiste no aquecimento do leite a  $62^{\circ}\text{C}$  -  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos; e pasteurização rápida, que consiste no aquecimento do leite a  $72^{\circ}\text{C}$  -  $75^{\circ}\text{C}$  por 15 a 20 segundos. O regulamento determina ainda que imediatamente após o aquecimento o leite seja refrigerado entre  $2^{\circ}\text{C}$  e  $5^{\circ}\text{C}$  e em seguida envasado.

Muito embora a especificação deste binômio tempo/temperatura esteja regulamentado por Legislação Federal, em 2006, o Governo do Estado do Rio de Janeiro, através de sua então representante, Rosinha Garotinho, com o Decreto 38.757, aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Estado do Rio de Janeiro, RIISPOA/RJ, que em seu artigo 122, onde trata da pasteurização do leite, no parágrafo quinto, encontra-se a aceitação do



aquecimento do leite à temperaturas entre 68°C e 70 °C por 2 a 5 minutos a vapor direto e filtrado, para o leite destinado à fabricação de queijos (RIO DE JANEIRO, 2006).

De acordo com Silveira e Abreu (2003) o tratamento térmico por injeção direta de vapor (IDV) foi considerado apropriado para a fabricação de queijo prato e afins, desde que associados às boas práticas de fabricação (BPF), estruturas e equipamentos modernizados e dentro dos padrões exigidos pelo MAPA.

Entretanto sabe-se que nem sempre tais cuidados são observados, principalmente em se tratando de pequenas indústrias e produções artesanais. A possibilidade do uso deste tipo de tratamento térmico para a fabricação de queijos de massa crua, como o queijo Minas Frescal, é preocupante, pois uma vez não observados todos os cuidados, este alimento pode tornar-se importante veículo de patógenos.

Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas, e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem para a má qualidade do produto final (SANTOS et al., 1981; MANDIL et al., 1982).

Apesar das exigências legais para que o leite destinado à produção de queijos seja higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1974), é intensa a comercialização do queijo Minas de forma irregular, fora dessas especificações, principalmente nas pequenas indústrias e estabelecimentos artesanais (BRAMLEY e MCKINNOM, 1990), que muitas vezes não recebem nenhuma fiscalização por parte dos órgãos governamentais.

Segundo Silva e Fernandes (2005) 40% de toda produção brasileira de leite é comercializada sem qualquer tipo de fiscalização, o que evidencia a informalidade e em parte justifica a baixa produtividade e qualidade, além de apontar a necessidade de mais rigor por parte da fiscalização.

A produção de queijo Minas Artesanal é tida como uma importante fonte de renda na agricultura familiar, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor desse tipo de queijo no Brasil (EMPRESA DE ASSISTENCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL, 2004). Porém quando este produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, com tecnologia inadequada e condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pode haver contaminação deste alimento por

micro-organismos patogênicos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança da saúde do consumidor (SILVA e LEITÃO, 1980).

A agricultura familiar tem ocupado um importante espaço no cenário nacional, e diversas políticas públicas de incentivo têm sido implementadas. Recentemente esta tendência foi ratificada, quando em seu discurso de posse, em 01 de janeiro de 2011, a presidenta eleita, Dilma Rousseff, manifestou seu apoio à agricultura familiar e ao microempreendedor.

O Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) desenvolveu o Plano Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (Pronaf). A agricultura familiar é responsável por 67% da produção nacional de feijão, 97% do fumo, 84% da mandioca, 31% do arroz, 49% do milho, 59% dos suínos, 40% de aves e ovos, 25% do café, 32% da soja e 52% do leite. Esta parcela do setor agropecuário ocupa 30,5% da área total dos estabelecimentos rurais, produz 38% do Valor Bruto da Produção (VBP) nacional e ocupa 77% do total de pessoas que trabalham na agricultura.

Em todo o país governos vêm intensificando ações neste âmbito como os programas Viva Leite e Leve Leite, em São Paulo e o Geraleite, na Bahia. Os estados nordestinos também têm verificado o desenvolvimento recente desses programas, por intermédio do Programa de Aquisição de Alimentos, como parte integrante do programa Fome Zero. O Programa do Leite para o Semi-Árido beneficia diariamente, 800 mil famílias e 25 mil produtores da região.

No Rio de Janeiro, o Governo do Estado, em dois anos, investiu cerca de R\$ 150 milhões no setor e a produção de leite saltou de 470 milhões de litros/ano, em 2007, para 600 milhões, em 2009. O setor da pecuária de leite movimenta U\$\$ 2,4 bilhões/ano no Rio, cerca de 100 mil pessoas trabalham no setor e atualmente o Estado conta com 60 empresas de laticínios. Os produtores podem também contar com programas de incentivo como o Rio Leite, Estradas da Produção e Rio Genética (RIO DE JANEIRO, 2010).

Os pecuaristas rurais brasileiros contam ainda com um programa de Gerenciamento de Propriedades Leiteiras, também conhecido como projeto Balde Cheio. Este programa foi idealizado pela Embrapa Pecuária Sudeste, e em parceria com o Serviço Brasileiro De Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR) e as Empresas de Extensão Rural de diversos estados levam aos produtores de leite, tecnologia,

desenvolvimento e competitividade, aumentando a quantidade e a qualidade do leite produzido.

De acordo com Furtado (1991), na fabricação de queijos, a qualidade do produto é diretamente proporcional à qualidade do leite utilizado como matéria prima, o que para alguns autores representa o ponto crítico de uma série de eventos que determinam a qualidade do queijo. A qualidade insatisfatória do leite cru e conseqüentemente, dos leites pasteurizados e esterilizados, assim como dos derivados, está relacionada a fatores como deficiências no manejo e higiene de ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou até inexistente, mão-de-obra desqualificada etc (BRAMLEY e MACKINNON, 1990).

Muito embora existam legislações, como as do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), que amparam e orientam a produção de queijo Minas Artesanal, como a Portaria Nº 818, de 12 de dezembro de 2006 que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Produção do Queijo Minas Artesanal (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2006) e a Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002 que dispõe sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas na Manipulação e Fabricação do queijo Minas Artesanal (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2002), e o cuidado de cadastrar os produtores deste tipo de alimento, pesquisadores vêm apontando a presença de micro-organismos patogênicos no produto (SILVA e LEITÃO, 1980).

O queijo Minas tem sido o objeto de estudo de vários pesquisadores em diferentes regiões do país, pois tem frequentemente sido relacionado à transmissão de doenças de origem alimentar, além do que, muitas são as espécies de micro-organismos que têm sido encontradas no leite e em queijos (ARAÚJO et al., 2002; CARDOSO e ARAÚJO, 2004; ROOS et al., 2005).

Segundo De Buyser et al. (2001), é difícil estimar a proporção das doenças transmitidas por leite e derivados, devido às limitações dos sistemas de vigilância. Estes autores descrevem que surtos de DTA, onde o leite e derivados lácteos estiveram envolvidos têm sido descritos em diferentes países.

Para a garantia da inocuidade, qualidade e integridade do leite e derivados, os estabelecimentos industriais contam com importantes procedimentos, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e as Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

O PPHO foi instituído pela Resolução DIPOA/SDA Nº 10, de 22 de maio de 2003 (BRASIL, 2003b), para ser utilizado em Estabelecimentos de Leite e Derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC.

Embora o APPCC seja um sistema amplo para a garantia da inocuidade, da qualidade e da integridade do alimento, este não deve ser considerado único e independente. Considera-se o APPCC uma ferramenta para controle de processo e não para o ambiente onde o processo ocorre. As BPF e o PPHO constituem, dessa forma, pré-requisitos essenciais à implantação do APPCC.

Constituindo uma extensão do Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos, o Manual de BPF estabelece os PPHO visando reduzir ou eliminar os riscos associados com a contaminação de leite e de produtos lácteos.

Os PPHO são procedimentos descritos, desenvolvidos, implantados e monitorizados, visando estabelecer a forma rotineira pela qual o estabelecimento industrial evitará a contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto, preservando sua qualidade e integridade por meio da higiene antes, durante e depois das operações industriais. Tais procedimentos têm como objetivo evitar a contaminação direta ou cruzada ou a adulteração dos produtos por meio das superfícies dos equipamentos, utensílios, instrumentos de processo e manipuladores de alimentos.

### **1.5 *E. coli* associada à DTA**

A presença de *E. coli* em alimentos tem sido de maneira enfática, relatada por pesquisadores (COLEN et al., 1984; DIAS et al., 1995; RODRIGUES et al., 1995; CARVALHO et al., 1996). Essa contaminação, além de identificar as más condições higiênicas do produto, indica, também, a possibilidade de transmissão de patógenos pertencentes aos grupos EPEC, ETEC, EIEC, EAEC e EHEC (LEVINE et al., 1987; NASCIMENTO et al., 1988; SABIONI et al., 1988; JAKABI e FRANCO, 1991).

Todas as cepas patogênicas de *E. coli* já estiveram diretamente relacionadas à alimentos, incluindo carnes, vegetais (RÚGELES et al., 2010), pescados

(VALENTE, 2004), leite e derivados lácteos (PANETO et al., 2007; Vernozy-Rozand et al., 2005) entre outros.

Atenção especial deve ser dispensada aos alimentos consumidos crus ou pouco cozidos e os de pronto consumo, como por exemplo, os pescados e os queijos frescos. Estudos realizados em queijo Minas Frescal e carne de Mexilhão vêm demonstrando o isolamento de patógenos de importância em Saúde Pública, com destaque para a bactéria *E. coli* (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 1994; REID, 2001; VALENTE, 2004; DIAS et al., 2010).

O cultivo de mexilhões é uma das modalidades mais produtivas que se conhece, entretanto, é característico dos mexilhões e demais bivalves filtrar, concentrar e reter em seus tecidos, micro-organismos patogênicos causadores de DTA, como demonstram os relatos de Marques e Pereira, (1988).

A presença de bactérias do grupo coliforme e *E.coli* em moluscos filtradores é uma ocorrência mundial, visto que exatamente nas zonas costeiras, baías e enseadas, locais ideais para a reprodução e crescimento dos bivalves, ocorrem escoamento de esgotos ou a desembocadura de rios que carregam contaminantes biológicos e químicos, os quais interferem diretamente na qualidade dos moluscos (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA S.A., 1994).

De acordo com a Resolução nº 357 de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005), as condições microbiológicas da água para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, devem ter a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras colhidas no mesmo local, não excedendo a 43/100 mL. Ressalta-se ainda que, segundo o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1988), os limites microbiológicos para áreas de criação, extração e manutenção de moluscos bivalves são: área proibida - acima de 700 coliformes fecais por 100 mL de água; área limitada - entre 70 e 700/100 mL, sendo indispensável o tratamento dos moluscos através da depuração; e área livre < 70/100 mL. Organizações internacionais como "Food and Drug Administration (FDA)", têm procurado através de princípios e normas, estabelecer o controle das condições sanitárias da água onde são cultivados os moluscos, objetivando garantir sua qualidade; e de acordo com o "The European Union Shellfish Quality Assurance Programme" (EUSQAP), os moluscos bivalves são classificados em três classes, e para cada uma é permitida uma quantidade de coliformes termotolerantes por 100 g de massa visceral e de líquido intervalvar: Classe A, tolerância < 300 CT/100g;

Classe B, 90% das amostras não podem exceder a 6.000 CT/100 g; Classe C, não podem exceder a 60.000 CT/100 g.

A preocupação em relação à qualidade sanitária deste alimento torna-se ainda mais relevante pelo hábito de consumir esse produto cru ou insuficientemente cozido, como ressaltam Wood (1996) e Dias et al. (2010).

Por diversas décadas, diferentes grupos de pesquisadores vêm relatando a presença de cepas patogênicas de *E. coli* em queijos, como demonstram os estudos de Nascimento et al. (1988), que revelaram o isolamento de cepas EPEC e EIEC em amostras de queijo Minas Frescal obtidas na cidade de Ouro Preto - Minas Gerais e Araújo et al. (2002), que isolaram cepas EPEC em amostras de queijo Minas Frescal analisadas na cidade do Rio de Janeiro. Cepas do grupo ETEC foram identificadas em queijo por Mac Donald et al. (1985) e Quinto e Cepeda (1997). O estudo de Daniels (2006), nos Estados Unidos, descreve a presença de cepas ETEC em diferentes produtos, incluindo queijos.

Cepas patogênicas de *E. coli* têm sido reportadas por diversos autores como a causa mais frequente de diarreia (TODD, 1997; STEINER et al., 1998), e têm sido associadas a quadros de desnutrição e mortes em países em desenvolvimento (TODD, 1997; STEINER et al., 1998; NATARO e KAPER, 1998).

De acordo com Beatty et al. (2006) e Devasia et al. (2006), diversas reportagens revelam o crescente envolvimento de cepas ETEC associadas a doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos, sugerindo que essa seja a ocorrência mais frequente nesse país. Mead et al. (1999), apontam que quadros de diarreia aguda são comuns nos Estados Unidos e estimam que 76 milhões de casos de DTA ocorram a cada ano.

Guerrant et al. (1990), citam que as doenças diarreicas são endêmicas em diversas regiões da Ásia, que são a principal causa de mortalidade, e que contribuem para a morte de 3,3 a 6 milhões de crianças anualmente (BERN et al., 1992).

De acordo com Todd (1997), ETEC continua sendo o maior problema de saúde em países em desenvolvimento, como também mostram os resultados dos estudos de Estrada-García et al. (2005), no México, onde cepas ETEC ocorreram em 27% dos casos seguidas das EAEC, que ocorreram em 26% dos casos estudados. Esses resultados concordam ainda com dados nacionais, onde Gomes et al. (1991) descrevem a importância das ETEC em São Paulo, sendo responsáveis por 7 a 20% de casos de diarreia infantil.

## 1.6 Isolamento, Detecção e Tipificação do Agente Etiológico

O isolamento a detecção e a tipificação do agente etiológico da diarreia são relevantes tanto para aspectos terapêuticos quanto para a implementação de estratégias de controle apropriadas (DUQUE et al., 2002). Para tanto, inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser utilizados e, atualmente têm sido divididos em métodos convencionais e métodos rápidos (FRANCO, 2004).

### 1.6.1 Métodos Convencionais

São técnicas desenvolvidas e descritas há bastante tempo, e que vêm sendo, desde então, empregadas como métodos oficiais nos laboratórios brasileiros. Esses métodos estão descritos em publicações de referência internacionalmente aceitas, e entre elas destacamos o “Bacteriological Analytical Manual” (BAM), publicado em conjunto pela “United States Food and Drug Administration” (FDA) e pela “Association of Official Analytical Chemists International” (AOAC International); o “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods”, editado pela “American Public Health Association” (APHA) e o “Microorganisms in Foods – their significance and methods of enumeration”, publicado pela “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF). “Existem ainda outros métodos recomendados por outras associações como a “International Organization for Standardization” (ISO), a “International Dairy Federation” (IDF) e outras (FRANCO, 2004).

Embora os métodos convencionais estejam bem estabelecidos e requererem materiais de consumo relativamente baratos, esses procedimentos apresentam algumas desvantagens, como serem extremamente laboriosos e demandarem a espera de vários dias para a liberação do laudo final.

#### 1.6.1.1 Sorotipificação

A identificação de cepas patogênicas de *E. coli* requer uma diferenciação destes micro-organismos dos membros não patogênicos da microbiota intestinal. A combinação dos antígenos O e H define o sorotipo dos membros da família

*Enterobacteriaceae* (NATARO e KAPER, 1998). De acordo com Ewing (1986) as amostras são sorotipadas com base em seus antígenos de superfície “O” (somático), “H” (flagelar) e “K” (capsular). Existem 183 O, 53 H e 100 antígenos “K” descritos. Os 53 tipos de H são numerados de 1 a 56.

Os antígenos somáticos “O” são termoestáveis e relacionados com polissacarídeos da membrana externa, são designados por números e caracterizam o sorogrupo do micro-organismo. Os antígenos “H” são termolábeis, representam a porção filamentosa do flagelo bacteriano que são constituídos por subunidades da proteína chamada flagelina. Os antígenos capsulares “K” são relacionados com polissacarídeos capsulares (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004). A maioria das amostras de *E. coli* são móveis, e possuem flagelo (KHAN, 1993).

Embora esse método seja valioso para a caracterização das cepas e ainda seja utilizado, ele apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, a necessidade do uso de um grande conjunto de anti-soros específicos, que comumente estão disponíveis apenas em laboratórios de referência (SWAMINATHAN e MATAR, 1993) e, além disso, alguns isolados bacterianos podem ser não-tipáveis pela sorotipagem clássica como no caso das cepas imóveis *E. coli*, que não possuem flagelo (MACHADO et al., 2000; PRAGER et al., 2003).

#### 1.6.2 Métodos Moleculares

A introdução de técnicas mais rápidas surgiu em consequência da necessidade de se abreviar o tempo de espera para a obtenção de resultados, melhorar a produtividade laboratorial e simplificar os trabalhos, entre outras. Alguns desses métodos apresentam maior sensibilidade e especificidade do que os convencionais (FRANCO, 2004).

Métodos Rápidos têm sido utilizados para estudar a epidemiologia molecular de diversos patógenos bacterianos e com isso caracterizar a variabilidade genética de amostras envolvidas em mortalidade, definição de grupos de amostras prevalentes, e identificação da origem de amostras virulentas (MACÊDO, et al., 2009).



Há pelo menos dez anos as técnicas de biologia molecular têm sido descritas na literatura como uma forma rápida e adequada para a identificação de cepas patogênicas de *E.coli*, incluindo ensaios de multiplex PCR (RÚGELES, et al., 2010).

Estudos sugerem que cada patotipo de *E. coli* patogênica apresente um ou mais genes específicos, ou uma combinação de fatores de virulência, que as distinguem das estirpes não-patogênicas e dos outros patotipos (SPHIGEL, 2008). Os genes codificadores desses fatores de virulência são conservados entre amostras isoladas provenientes de diferentes continentes (NGUYEN et al., 2005; ARANDA et al., 2007; BRANDAL, et al., 2007).

#### 1.6.2.1 “Polymerase Chain Reaction” (PCR) e multiplex PCR (M-PCR)

Um progresso substancial tem sido alcançado no desenvolvimento de metodologias baseadas na análise de ácidos nucléicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (NATARO e KAPER, 1998). Esse método é baseado na amplificação de sequencias específicas de DNA ou RNA (ERLICH, 1992). Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são as maiores vantagens deste método (MALORNY et al., 2003).

A detecção pelo sistema M-PCR, que consiste na amplificação simultânea de vários genes pelo uso de múltiplos pares de iniciadores ou “primers” específicos (ATLAS e BEJ, 1994), têm sido descrita como uma solução apropriada para o desafio de encontrar *E. coli* diarréiogênicas em alimentos e amostras clínicas (LÓPEZ-SAUCEDO et al., 2003), além de ser também descrita como um método eficiente para a identificação deste micro-organismo em amostras ambientais (“CENTERS FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION”, CDC, 1996; MARTINEZ et al., 2007).

Pesquisadores de diversos países da América Latina obtiveram sucesso com a introdução do uso desta técnica para identificar *E.coli* patogênica em seus países, incluindo Argentina (RIVAS, et al., 2006), Brasil (ARANDA et al., 2007; MORENO et al., 2010), Chile (VIDAL et al., 2005) e México ESTRADA-GARCIA et al., 2009).

### 1.6.2.2 “Multilocus Sequence Typing” (MLST)

Mais recentemente outro método molecular foi desenvolvido para o estudo de genética de populações, tipificação de micro-organismos e estudos epidemiológicos de longo prazo, o MLST. Esta técnica foi desenvolvida com o objetivo de acompanhar a patogenicidade bacteriana com uma perspectiva global de epidemiologia. Neste método, os fragmentos internos de vários genes “housekeeping”, ou seja, genes constitutivos conservados, de evolução lenta e normalmente codificantes de enzimas metabólicas ou proteínas de regulação, são sequenciados (MAIDEN et al., 1998) e as sequências nucleotídicas são utilizadas como unidades de comparação em bancos de dados específicos, não havendo assim a possibilidade de erros pela subjetividade da interpretação de geis como no “Multilocus Enzyme Electrophoresis” (MLEE), método precursor do MLST desenvolvido por Selander et al. (1986).

A técnica de MLST envolve o sequenciamento desses fragmentos específicos e a designação de perfis de alelos, chamados “Sequence Types” (ST) (OLVERA et al., 2006). Este método tem sido utilizado com sucesso para a determinação dos ST e os complexos clonais (cc) a eles associados, de vários patógenos humanos e animais (COOPER e FEIL, 2004), e tem sido descrito como uma poderosa ferramenta a ser usada em estudos de longo prazo pelos sistemas de vigilância epidemiológica (TARTOF et al., 2005).

Trata-se de um sistema de fácil portabilidade, pois as sequências de dados podem ser facilmente comparadas e analisadas entre laboratórios (ENRIGHT e SPRATT, 1999; MAIDEN et al., 1998). O formato digital dos dados do MLST facilitou o estabelecimento de uma base de dados única para cada micro-organismo podendo ser consultada via internet para a comparação de alelos e obtenção rápida dos ST e seus complexos clonais, contribuindo para o entendimento da distribuição clonal dos agentes de doenças infecciosas (TARTOF et al., 2005).

### 1.6.2.3 PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Alternativa ou complementarmente aos testes clássicos de sorotipagem, alguns autores vêm sugerindo, e apresentando resultados bastante significativos, como a utilização da técnica de “PCR-restriction fragment length polymorphism”

(PCR-RFLP). Essa técnica tem demonstrado uma redução considerável do tempo de análise, podendo fornecer o resultado em dois dias, enquanto que com a técnica clássica seria preciso ao menos sete dias para a obtenção dos sorotipos (MORENO et al., 2006). Fields et al. (1997), desenvolveram um teste de PCR-RFLP para identificar e caracterizar o gene *fliC*, que codifica a proteína flagelina relacionada ao antígeno H, responsável por determinar a mobilidade do micro-organismo. Esse método tem demonstrado ser uma importante ferramenta para detecção bacteriana por afinidade genética e por estudos epidemiológicos (AMHAZ et al., 2004; BOTELHO et al., 2003; COIMBRA et al., 2001; WANG et al., 2000; ZHANG et al., 2000; MACHADO et al., 2000; REID et al., 1999; FIELDS et al., 1997).

Prager et al. (2003), demonstraram em seus estudos que com o uso da PCR-RFLP, seria possível a identificação de amostras imóveis e ainda de cepas com antígeno H não tipável, além de reportar uma correlação muito boa entre a técnica molecular e a clássica. Machado et al. (2000) citaram ainda que as amostras sorologicamente não tipáveis poderiam ser classificadas de acordo com o polimorfismo do *fliC*, dentro dos já conhecidos grupos de antígenos H e que ainda o grupo *fliC* poderia ser usado para detectar novas classes de antígeno H. De acordo com Campos et al. (1994) e Gomes et al. (1989), amostras imóveis são frequentes entre EPEC típica e atípica e STEC.

### 1.6.3. Considerações complementares

As técnicas moleculares não necessariamente substituem os métodos convencionais. Elas são direcionadas a questões que não são resolvidas ou então que seriam mais trabalhosas e/ou mais demoradas de serem solucionadas se fossem utilizadas técnicas convencionais (FOXMAN e RILEY, 2001). Entretanto, é necessário considerar as características epidemiológicas de cada surto da doença, associadas a uma técnica adequada segundo sua capacidade de discriminação entre as amostras (MACEDO, et al., 2009).

## **2. Objetivos**

---

### **2.1 Objetivo Geral**

- Caracterizar genotipicamente os isolados de *E. coli* obtidos a partir de amostras de queijo Minas Frescal, comercializados com ou sem serviço de inspeção na região metropolitana do Rio de Janeiro.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Isolar cepas patogênicas de *E. coli* a partir das amostras de queijo Minas Frescal analisadas;
- Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas patogênicas isoladas;
- Avaliar a motilidade das *E. coli* isoladas, e em caso de cepas imóveis, caracterizá-las genotipicamente através da PCR- RFLP do gene *fliC*;
- Otimizar a multiplex PCR para a detecção simultânea dos genes de virulência das cepas patogênicas de *E. coli*: EPEC, ETEC, STEC, EAEC e EIEC;
- Certificar a presença dos genes de virulência amplificados pela multiplex PCR, por meio de sequenciamento;
- Realizar a tipificação genética dos isolados pela análise do MLST;
- Determinar os “Sequence Types” e os complexos clonais dos isolados.

### **3. Material e Métodos**

---

#### **3.1 Obtenção das amostras**

Um total de trinta amostras, entre produtos inspecionados e artesanais sem inspeção, de queijo Minas Frescal foi utilizado neste estudo.

Inicialmente as análises foram realizadas com quinze unidades de queijo Minas Frescal, de três marcas comerciais diferentes, utilizando amostras representativas (BRASIL, 2001), sendo cada uma destas constituída de cinco unidades de queijo Minas Frescal de mesmo número de lote e mesmas datas de fabricação e validade.

Posteriormente, foram realizadas análises utilizando amostras indicativas onde apenas uma unidade de queijo Minas Frescal de cada lote e marca foi analisada (BRASIL, 2001). Quinze amostras indicativas foram analisadas, e destas, sete possuíam algum selo de serviço de inspeção e oito foram de origem artesanal sem inspeção.

O total das trinta amostras de queijo Minas Frescal analisado, sendo destas 22 amostras comercializadas com selo de serviço de inspeção e 8 amostras artesanais, comercializadas sem inspeção, foi adquirido em supermercados da região metropolitana do Rio de Janeiro, ou em eventuais pontos de venda para os produtos de origem artesanal.

Todas as amostras foram compradas em suas embalagens originais, não violadas, observando a quantidade mínima de 200 gramas por unidade amostral, conforme indicado na RDC nº 12 (BRASIL, 2001) e analisadas dentro de seu prazo de validade. Foram aferidas as temperaturas do balcão frigorífico do local de aquisição e das amostras na chegada ao laboratório, que não ultrapassou 8°C. Sempre que possível o mesmo procedimento foi realizado para os produtos de origem artesanal.

Após a aquisição, as amostras foram acondicionadas em embalagens individuais, fechadas e intactas, e conduzidas ao laboratório sob refrigeração.

As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz.

### 3.2 Isolamento das cepas patogênicas

A técnica microbiológica utilizada foi uma adaptação do método descrito no “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003). As etapas descritas a seguir podem ser acompanhadas na Figura 1.

Alíquotas de 25 gramas de cada amostra foram pesadas assepticamente, acrescidas de 225 mL caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (MERK) (fator de diluição 1:10) e transferidas para embalagem plástica do homogeneizador tipo “Stomacher”. A mistura foi homogeneizada durante 60 segundos, em velocidade média e o homogenato incubado por 10 minutos com agitação periódica em temperatura ambiente e posteriormente mantido em repouso por mais 10 minutos, para que a amostra depositasse por ação da gravidade. O material foi incubado por 3h a 35°C para pré-enriquecimento e recuperação das células injuriadas. Após esse período o pré-enriquecimento foi transferido para 225 mL de caldo Triptona Fosfato (TP) em dupla concentração e incubado por 20h a  $44.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Em sequência, foi realizada semeadura por esgotamento em “Eosin Methylene Blue Agar, Levine” (L-EMB) (MERK) e Agar MacConkey (MC) (MERK) e então incubados por 20h a 35°C, para isolamento das colônias.

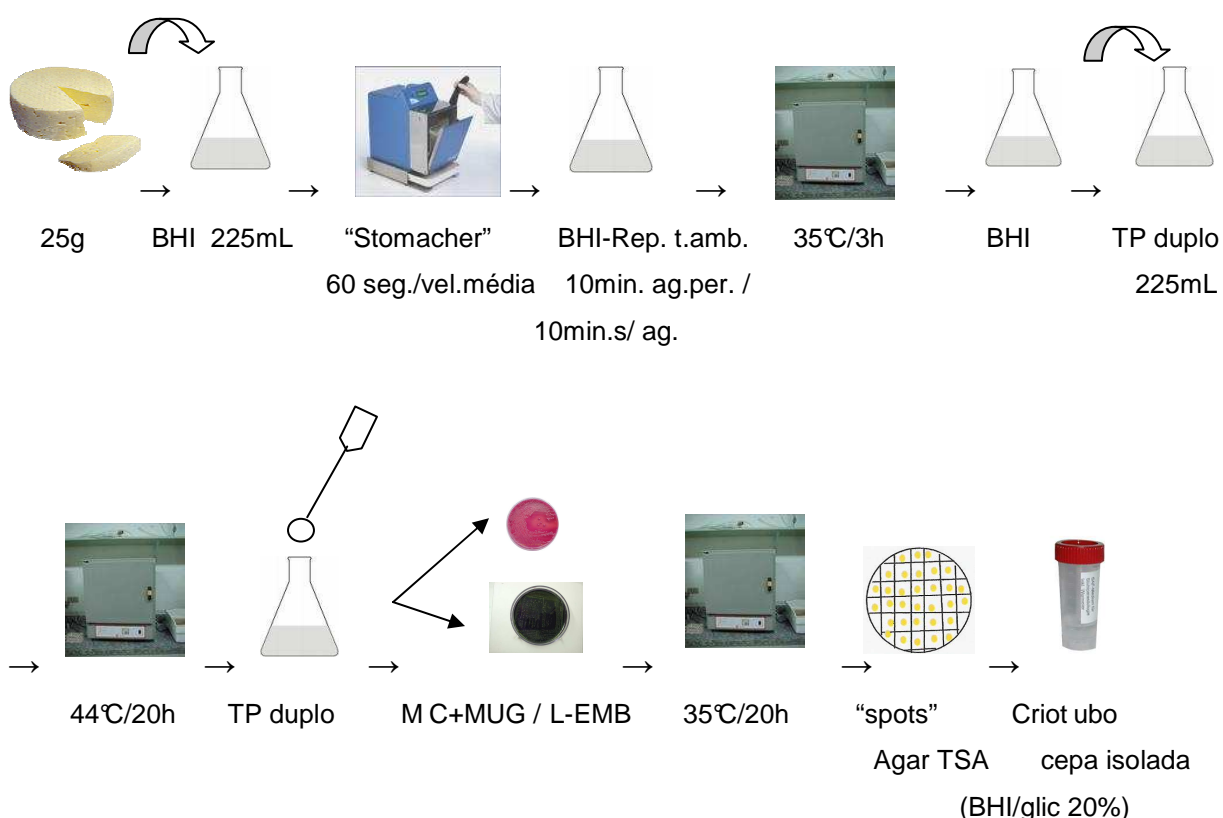
Com o objetivo de fazer uma triagem das colônias isoladas para detectar a presença de *E.coli*, foi associado ao meio MC, 50mg/L do suplemento 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glicuronídeo (MUG). Este substrato é hidrolisado pela enzima  $\beta$ -glicuronidase, que cliva o MUG com a liberação de 4-metil-umbeliferona, que emite uma fluorescência azulada quando exposto à lâmpada de luz ultravioleta (0 a 6 W) de ondas longas (365 nm) facilmente visualizada no meio ou ao redor das colônias. Mais de 95% das *E. coli* produzem a enzima  $\beta$ -glicuronidase, sendo exceção a cepa EHEC sorotipo O157: H7 (CARDOSO, 1999).

Para este estudo cerca de 160 colônias, entre típicas e atípicas, de cada amostra, foram selecionadas, semeadas em “spots” em placa-mestre de Agar Triptose Soja (TSA) (MERK), incubadas a 37°C/24h e estocadas em criotubos compostos de caldo BHI e glicerol 20% em freezer à - 20°C, para posterior

identificação microbiana, por confirmação bioquímica, avaliação da susceptibilidade antimicrobiana e caracterização genotípica.

Após a caracterização genotípica as cepas patogênicas identificadas foram mantidas criopreservadas em temperaturas de - 20°C ou - 70°C e depositadas na Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ.

**FIGURA 1:** Isolamento de *E.coli* patogênica em amostras de queijo Minas Frescal



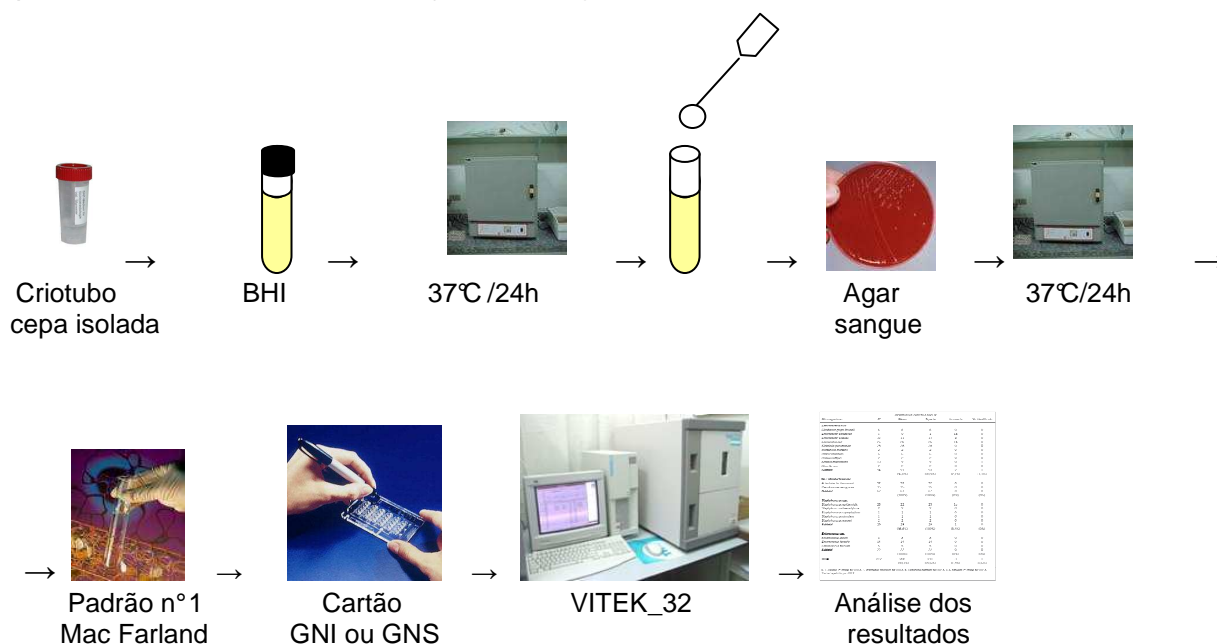
### 3.3 Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana

A avaliação da susceptibilidade antimicrobiana e da presença de cepas produtoras da enzima  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) foi realizada através do sistema VITEK\_32 – GNS (BioMerieux), e a metodologia baseada nas informações do fabricante. As etapas podem ser acompanhadas na Figura 2.

A avaliação da susceptibilidade foi baseada no "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI). Os antimicrobianos testados, suas siglas e Concentração Inibitória

Mínima (MIC), em mcg/mL, foram respectivamente: Amicacina (NA; 2), Ampicilina (AM; 32), Ampicilina-Sulbactam (MAS; 16), Azetreonam (AZM; 8), Cefepima (FEP; 4), Cefotaxima (TAX; 4), Cefoxitima (FOX; 2), Ceftazidima (TAZ; 8), Cefalotina (CF; 8), Ciprofloxacina (CIP; 0.5), Gentamicina (GM; 0.5), Imipenem (IMI; 4), Meropenem (MEM; 2), Piperacilina-Tazobactam (TZP; 8) e Trimetoprim-Sulfa (STX; 10).

**FIGURA 2:** Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana das cepas patogênicas isoladas pelo sistema VITEK\_32 – GNS (BioMerieux).



### 3.4 Teste de Motilidade

O teste de motilidade indica indiretamente a produção de flagelos. Esta não é uma prova bioquímica e sim fisiológica.

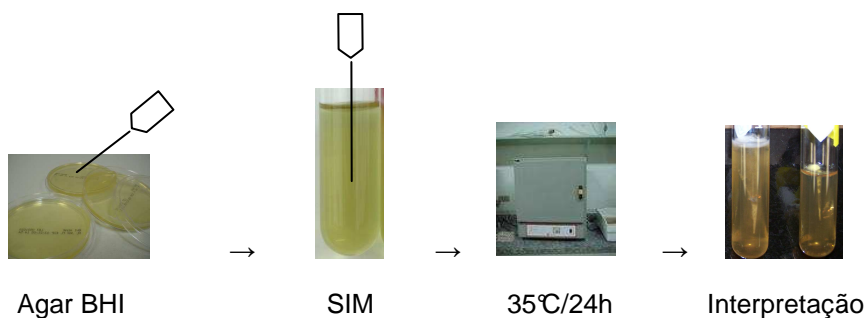
O teste foi realizado a partir de um crescimento de 24 horas em Agar BHI, e com o auxílio de uma agulha bacteriológica, uma alíquota deste crescimento foi inoculada no centro do meio semi-sólido Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM), até 2/3 do meio. O meio foi incubado em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas (KONEMAN et al., 2001). As etapas do teste podem ser acompanhadas na Figura 3.



## INTERPRETAÇÃO:

- O resultado é considerado positivo (cepa móvel) quando os micro-organismos crescem deslocando-se da linha de inoculação, turvando o meio.
- O resultado é considerado negativo (cepa imóvel) quando a bactéria tem seu crescimento restrito ao local da inoculação.

**FIGURA 3:** Teste de Motilidade das cepas patogênicas isoladas



## 3.5 Extração de DNA

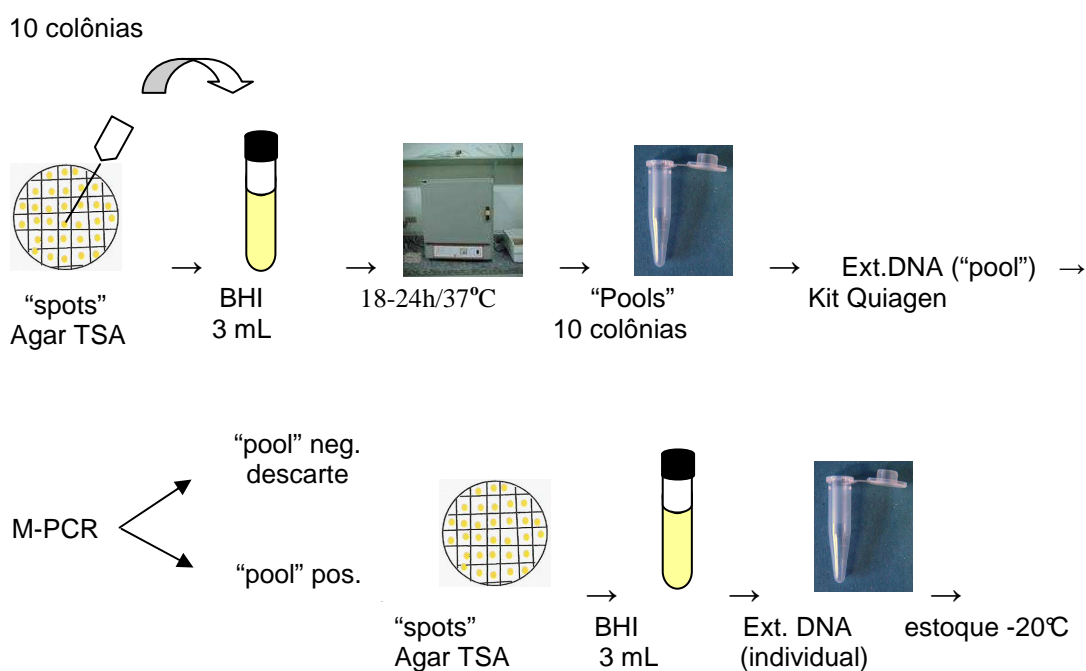
O protocolo utilizado para a extração de DNA seguido nesse estudo foi baseado em informações do fabricante do kit comercial “Dneasy Tissue kit” (“QIAGEN Companies – Uniscience” do Brasil, São Paulo, SP).

A partir dos “spots” em Agar TSA, das 160 colônias entre típicas e atípicas isoladas de cada amostra, procedeu-se a extração do DNA. Inicialmente, para uma primeira triagem, a extração foi realizada a partir de “pools” de 10 colônias. Com auxílio de uma agulha bacteriológica, as colônias foram “pescadas” e colocadas em tubo tipo “eppendorff” contendo caldo BHI. A cada 10 colônias “pescadas” e colocadas em um mesmo tubo formava-se 1 “pool” contendo o inóculo das 10 colônias. Desta forma, as 160 colônias isoladas foram reunidas em 16 “pools” de 10 colônias. Cada “pool” foi incubado por 18-24h/37°C, com a finalidade de se obter células bacterianas jovens. A partir de então se seguiu as instruções do fabricante para a extração do DNA.

Após a extração do DNA e a realização da Multiplex PCR (Figura 4), o resultado foi analisado e observado se algum dos “pools” testados apresentava resultado sugestivo de positividade para cepas patogênicas de *E. coli*. Caso esta

fosse a interpretação, voltava-se à placa-mestre de Agar TSA e cada uma das 10 colônias constituintes do “pool” suspeito, era cultivada individualmente, em caldo BHI, para a obtenção de células bacterianas jovens e subsequentemente realizava-se a extração de DNA individual. Esse DNA era, então, estocado em freezer à -20°C, para análises posteriores.

**FIGURA 4:** Extração do DNA “pool” e individual



### 3.6 Caracterização Genotípica

O DNA das amostras previamente extraído e estocado à -20°C foi utilizado para as análises genotípicas.

Todas as soluções reagentes utilizadas para a caracterização genotípica neste estudo foram adquiridas da “Invitrogen Life Technologies” (São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas à temperatura de -20°C.

### 3.6.1 Cepas de referência

Neste estudo foram utilizadas cinco cepas de referência, cada uma pertencendo a um grupo de *E. coli* diarreiogênica: cepas INCQS 00181 (CDC 055) - EPEC; INCQS 00171 (CDC EDL – 933) - EHEC e INCQS 00170 (CDC EDL – 1284) - EIEC, provenientes do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ; uma cepa ETEC – 258909-3 (CFA/I<sup>+</sup> 0128:H –; LT+/ST+) proveniente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e uma cepa EAEC (2391) oriunda do Instituto Adolfo Lutz – SP (IAL). Todas as cepas foram suspensas em 10 ml de caldo casoy (“Trypticase Soy Broth” - TSB) (Merck) e incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação à 150 rpm (L.E.D. “Orbit Shaker, Lab-line Instruments”, Inc., Melrose park, ILL, USA).

### 3.6.2 Identificação das cepas patogênicas de *E.coli* pela Multiplex PCR

Para gerar o perfil utilizado como controle positivo desta reação, o DNA molde de cada uma das cepas de referência foi adicionado concomitantemente ao mix da reação.

#### 3.6.2.1 “Primers” utilizados

As sequências dos pares de “primers” SK1 e SK2, Vtcom-u e Vtcom-d, EST-F e EST-R, ELT-F e ELT-R, ipaIII e ipaIV, aggRks1 e aggRkas2 utilizados neste estudo encontram-se detalhadas na Tabela 1. Os “primers” utilizados foram adquiridos comercialmente da “Invitrogen Life Technologies” (São Paulo, SP, Brasil), hidratados com água purificada isenta de *DNase* e *RNase* e ficaram estocados em alíquotas de 100 µl à –20°C.

#### 3.6.2.2 Cepas controle e genes alvo

Foram utilizadas como controle positivo, de todas as reações da Multiplex PCR, as cinco cepas de referência de *E. coli* diarreiogênica, mencionadas acima. Os

genes alvos selecionados para cada categoria de *E.coli* patogênica foram: *eae* para EPEC; *est* e *elt* para ETEC; *stx* para STEC; *aggR* para EAEC e *ipaH* para EIEC. Os componentes da reação sem DNA foram usados como controle negativo das reações.

**TABELA 1:** Genes, “primers” e sequências utilizados na Multiplex PCR

Gene	“Primer”	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Temp. Anel (°C)	Referência
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	50	Oswald et al. (2000)
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG			
<i>stx</i>	Vtcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	518	50	Yamasaki et al. (1996)
	Vtcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT			
<i>est</i>	EST-F	ATTTTCTTTCTGTATTGTCTT	190	50	López-Saucedo et al. (2003)
	EST-R	CACCCGGTACARGCAGGATT			
<i>elt</i>	ELT-F	GGCGACAGATTATACCGTGC	450	50	López-Saucedo et al. (2003)
	ELT-R	CGGTCTCTATATCCCTGTT			
<i>ipaH</i>	ipaIII	GTTCCCTTGACCGCTTTCCGATACCGTC	619	50	Sethabutr et al. (1993)
	ipaIV	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	50	Ratchtrachenchai et al. (1997)
	aggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			

### 3.6.2.3 Componentes e condições da Multiplex PCR

A reação de M-PCR utilizada foi baseada nos estudos de TOMA et al. (2003) e otimizada nesta pesquisa.

As amplificações da PCR foram efetuadas em um volume final de 50 µL, contendo 50 -100 ng de DNA molde das cepas de referência ou de DNA molde das amostras, tampão PCR 10x, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.07 U/µL de *Taq* DNA polimerase, 0.3 mM de dNTP, 1.25 µM para os “primers” SK1 e SK2, 0.25 µM para os “primers” Vtcom-u e Vtcom-d, 0.50 µM para os “primers” EST-F e EST-R, 0.25 µM para os “primers” ELT-F e ELT-R, 0.10 µM para os “primers” ipaIII e ipaIV, 0.25 µM para os “primers” aggRks1 e aggRkas2, e água livre de *DNase* e *RNase* para completar o volume de 50 µL.

Todas as reações de multiplex PCR para identificação dos genes alvo das cepas diarreiogênicas de *E.coli*, realizadas neste estudo, ocorreram no termociclador

da marca PTC-200 “Peltier Thermal Cycler – MJ Research Inc.” (“Watertown”, MA, USA).

As condições usadas na reação foram: 2 min por 95°C , seguidos de trinta ciclos nas condições: desnaturação - 95°C por 30 seg; anelamento - 50°C por 30 seg; extensão - 72°C por 1 min; extensão final - 72°C por 10 min.

Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (Sigma), marcados com brometo de etídeo (0,25µg/mL), tiveram as imagens digitalizadas no “Vídeo Documentation System-VDS” e analisadas com o “software ImageMaster” (“Amersham Pharmacia Biotek”).

Após a interpretação dos resultados da Multiplex PCR os produtos da reação, das cepas positivas, foram purificados com o Kit comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN GmgH, Hilden, Germany) e submetidos à reação de sequenciamento com terminadores fluorescentes (“Big Dye, Applied Biosystems”, Foster City CA) usando apenas o “primer Forward” específico para o gene suspeito. Os produtos da reação de sequenciamento foram enviados à Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ e analisados no sequenciador automático de DNA “Applied Biosystems ABI Prism” 3730.

### 3.6.3 Caracterização genotípica por MLST

O protocolo da PCR-MLST utilizado para amplificação dos genes alvo neste encontra-se descrito no site <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>.

#### 3.6.3.1 “Primers” utilizados e genes alvo

Os genes alvo e as sequências dos “primers” utilizados na amplificação dos genes preconizados pelo MLST, encontram-se detalhados na Tabela 2. Para o sequenciamento dos fragmentos amplificados foram utilizados os mesmos “primers”. Esses iniciadores foram adquiridos comercialmente da “Invitrogen Life Technologies” (São Paulo, SP, Brasil), hidratados com água purificada isenta de *DNase* e *RNase* e estocados em alíquotas de 100 µL à - 20°C.

O MLST foi realizado baseado na sequência de nucleotídeos dos sete genes housekeeping citados no site mencionado acima e encontram-se descritos a seguir:

*adk* (adenilato quinase); *fumC* (fumarato hidratase); *gyrB* (DNA girase); *icd* (isocitrato/isopropilalato desidrogenase); *mdh* (malato desidrogenase); *purA* (adenilosuccinatodesidrogenase) e *recA* (proteína de ligação do DNA).

**TABELA 2:** Genes, "Primers" e sequências utilizados na PCR-MLST

Gene	"Primer"	Sequência (5' - 3')	Temp. Anel (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>adk</i>	adkF	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	54	583	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	adkR	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT			
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	54	806	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			
<i>gyrB</i>	gyrBF	TCGGCGACACGGATGACGGC	60	911	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	gyrBR	ATCAGGCCTTCACGCGCATC			
<i>icd</i>	icdF	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCC	54	878	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	icdR	GGACGCAGCAGGATCTGTT			
<i>mdh</i>	mdhF	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCG	60	932	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	mdhR	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGC GATATCTTTCTT			
<i>purA</i>	purAF	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	54	816	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	purAR	CATACGGTAAGCCACGCAGA			
<i>recA</i>	recAF	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	58	780	<a href="http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst">http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst</a>
	recAR	TCGTCAAATCTACGGACCGGA			

### 3.6.3.2 Componentes e condições da PCR-MLST

As amplificações da PCR-MLST foram efetuadas em volume final de 50 µL, contendo 50 – 100 ng de DNA molde, 0,5 µM de cada "primer", 50 µM de cada dNPT, tampão PCR 10x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de *Taq* polimerase e água livre de *DNase* e *RNase* para completar o volume de 50 µL.

Todas as reações de PCR-MLST, realizadas neste estudo, ocorreram no termociclador PTC-200 "Peltier Thermal Cycler" – MJ Research Inc. (Watertown, MA, USA) e seguiram o programa abaixo descrito.

As condições usadas na reação foram: 2 min por 95°C, seguidos de: 30 ciclos nas condições: desnaturação - 95°C por 1min; anelamento - 1 min na temperatura

específica para cada gene; extensão - 72°C por 2 min; extensão final - 72°C por 5 min.

Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (Sigma), marcados com brometo de etídeo (0,25µg/mL), tiveram as imagens digitalizadas no “VÍdeo Documentation System-VDS” e analisadas com o “software ImageMaster” (“Amersham Pharmacia Biotech”).

Estes produtos foram purificados com o kit comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (QUIAGEN GmGH, hilden, Germany) e sequenciados.

### 3.6.3.3 Análise das Sequências

Após verificar a qualidade das sequências (“Sequencher 4.9 - Gene codes corporation”) estas foram comparadas com as sequências do banco de dados de MLST, para obtenção dos alelos de cada gene. A partir de então, um grupo de 7 genes foi determinado dando origem ao perfil de alelos de cada cepa. Os perfis de alelos diferentes daqueles já descritos foram enviados para o banco dados para avaliação e determinação de novos ST.

## **4. Resultados**

---

### **4.1 Cepas patogênicas isoladas**

A utilização da metodologia adaptada resultou no isolamento de cepas de *E.coli* a partir das amostras de queijo Minas Frescal, assim como ocorrido com sucesso no estudo do isolamento de *E.coli* em amostras de carne de mexilhão, realizado no mesmo período do desenvolvimento do presente trabalho. Neste estudo, 44 cepas de *E. coli* foram isoladas de carne de mexilhão e submetidas à avaliação da susceptibilidade antimicrobiana. Os resultados foram publicados e podem ser observados no anexo 1.

Nas 30 (100%) amostras de queijo Minas Frescal analisadas foram observados isolados que apresentaram características fenotípicas que sugeriam a identificação de *Escherichia coli*.

Do total das amostras, cinco cepas enteropatogênicas de *E.coli* foram isoladas. As EPEC isoladas foram provenientes de uma amostra de queijo Minas Artesanal, correspondendo a 12,5% das amostras deste tipo de queijo analisado.

Os isolados foram depositados na Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, sob os números: INCQS P3452, INCQS P3453, INCQS P3454, INCQS P3455 e INCQS P3456.

### **4.2 Motilidade e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana**

Todas as EPEC isoladas foram identificadas como cepas móveis e, portanto, não foi realizada a PCR-RFLP.

Das EPEC identificadas, 40% apresentaram resistência ao antimicrobiano ampicilina e 40% perfil de resistência intermediária para a associação ampicilina-sulbactam. Embora casos de *E. coli* multiresistentes sejam frequentemente descritos, tal fato não foi observado neste estudo. As cepas foram consideradas sensíveis a todos os outros antimicrobianos testados.

As cepas EPEC isoladas não revelaram a presença de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL).

Estes resultados podem ser observados na Tabela 3.



**TABELA 3:** Visualização dos resultados da análise da susceptibilidade antimicrobiana, presença de ESBL e teste de motilidade das EPEC isoladas

Antimicrobianos MIC (mcg/mL)	Cepas				
	MTD1	MTD2	MTD3	MTD4	MTD5
Amicacina (2)	S	S	S	S	S
Ampicilina (32)	R	S	R	S	S
Ampicilina- Sulbactam (16)	I	S	I	S	S
Azetreonam (8)	S	S	S	S	S
Cefepima (4)	S	S	S	S	S
Cefotaxima (4)	S	S	S	S	S
Cefoxitima (2)	S	S	S	S	S
Ceftazidima (8)	S	S	S	S	S
Cefalotina (8)	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina (0.5)	S	S	S	S	S
Gentamicina (0.5)	S	S	S	S	S
Imipenem (4)	S	S	S	S	S
Meropenem (2)	S	S	S	S	S
Piperacilina- Tazobactam (8)	S	S	S	S	S
Trimetoprim- Sulfa (10)	S	S	S	S	S
ESBL	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Motilidade	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

### 4.3 Caracterização Genotípica

#### 4.3.1 Cepas patogênicas de *E. coli* identificadas pela Multiplex PCR

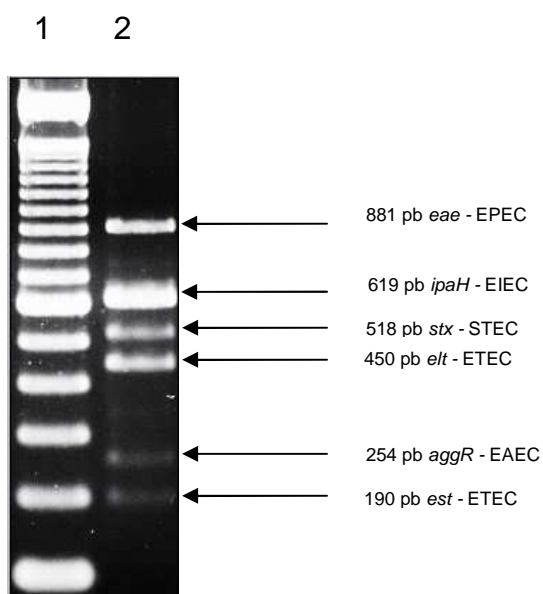
A partir das colônias isoladas, cinco cepas EPEC foram identificadas pela multiplex PCR.

##### 4.3.1.1 Multiplex PCR otimizada

Inicialmente foi realizada a otimização do protocolo da multiplex PCR para que todos os genes alvo (*eae* para EPEC; *est* e *elt* para ETEC; *stx* para STEC; *aggR* para EAEC e *ipaH* para EIEC) pudessem ser amplificados simultaneamente na reação, como observado na Figura 5.

Esse perfil foi utilizado como controle positivo de todas as reações de multiplex PCR deste estudo, o DNA molde de cada uma das cepas de referência foi adicionado concomitantemente ao mix da reação.

**FIGURA 5:** Visualização da amplificação pela M-PCR das cepas de *E. coli* patogênica utilizadas como controle positivo

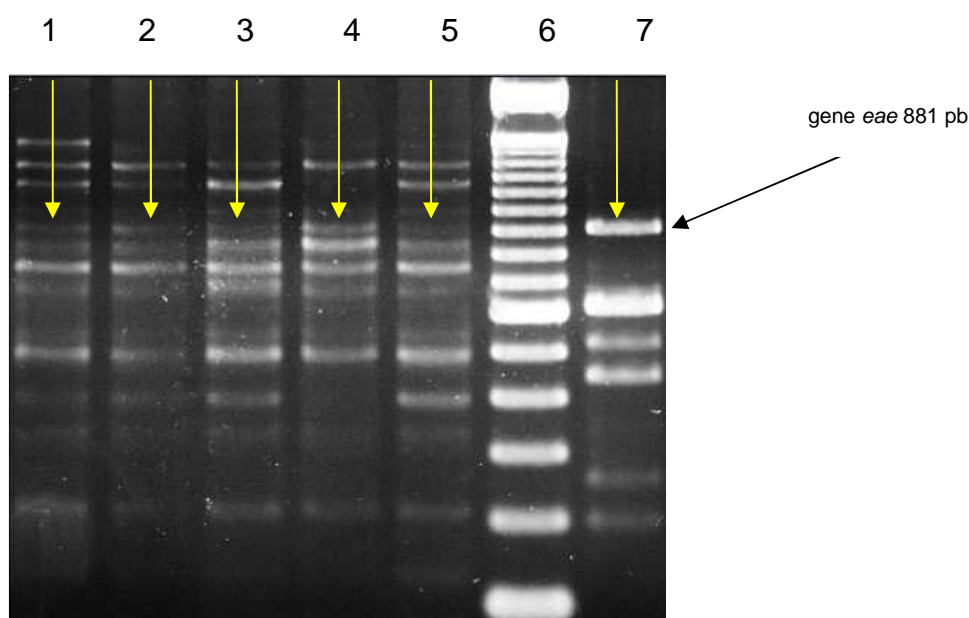


1 - marcador de peso molecular – Kb (DNA ladder 100 pb); 2 - controle positivo.

#### 4.3.1.2 Triagem inicial dos “pools” de 10 colônias através da Multiplex PCR

Para análise de cada uma das amostras procedeu-se a triagem inicial através da multiplex PCR dos “pools” de 10 colônias (Figura 6). Os “pools” analisados, como já esperado, apresentaram muitos fragmentos, entretanto, somente o fragmento de 881pb, presente nos “pools” indicados apresentaram posição equivalente ao fragmento do gene *eae*. Após a interpretação dos resultados, os “pools” negativos foram descartados e os suspeitos submetidos a novas análises genotípicas para confirmação.

**FIGURA 6:** Visualização da amplificação pela M-PCR dos “pools” de 10 colônias para triagem inicial, sugerindo a amplificação do gene *eae*

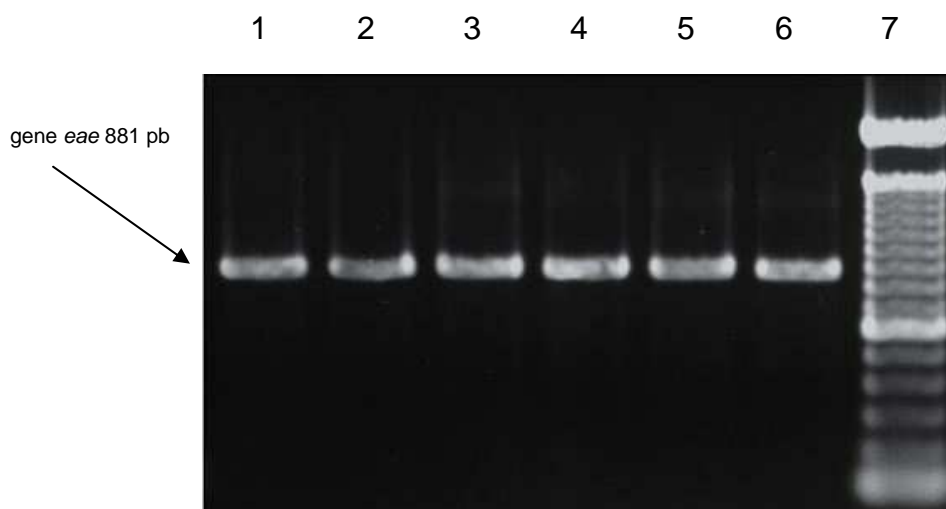


1 a 5 - “pools” suspeitos, sugerindo a amplificação do gene *eae* (banda 881pb);  
6 - marcador de peso molecular Kb (DNA ladder 100 pb); 7 - controle positivo (multiplex)

#### 4.3.1.3 Gene suspeito (*eae*) amplificado através da Simplex PCR

Após a triagem inicial, voltou-se à placa mestre de agar TSA para extração de DNA individual das cepas pertencentes aos “pools” suspeitos. As cepas suspeitas foram submetidas individualmente à nova amplificação para confirmação da presença do gene *eae* (Figura 7). Estas cepas foram isoladas de uma amostra de queijo Minas Artesanal.

**FIGURA 7:** Visualização da amplificação pela simplex PCR das cepas individuais exibindo a amplificação apenas do gene suspeito (*eae*)



1 - controle positivo EPEC (gene *eae*); 2 a 6 amostras positivas MTD1, MTD 2, MTD3, MTD4, MTD5 respectivamente; 7 - marcador de peso molecular – Kb (DNA ladder 100 pb)

#### 4.3.1.4 Cepas positivas sequenciadas e depositadas no banco de dados

Os fragmentos dos 5 isolados foram purificados com o Kit comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN GmgH, Hilden, Germany) e sequenciados para a confirmação, usando o “primer forward” específico para o gene *eae*. Para o sequenciamento foi preparado um “Mix” contendo 200-300 ng do DNA suspeito e o “primer” específico na concentração de 1,6 pmol/ $\mu$ L.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências já depositadas no banco de dados do NCBI e foram confirmadas como *E. coli* enteropatogênica (Tabela 4). As amostras isoladas foram nomeadas MTD1, MTD2, MTD3, MTD4 e MTD5, e depositadas no GenBank/NCBI sob os respectivos números de acesso: MTD1 HQ834724; MTD2 HQ834725; MTD3 HQ834726; MTD4 HQ834727; MTD5 HQ834728.

**TABELA 4:** Alinhamento das sequências dos genes eae, identificados a partir das amostras de *E. coli* isoladas de queijo Minas Frescal, com as sequências anteriormente depositadas no GenBank/NCBI

**MTD1**

**Sequences producing significant alignments:**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<u>AP010953.1</u>	Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome	0.0	99%
<u>FM201464.1</u>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain 9812	0.0	99%
<u>FM201463.1</u>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain B6	0.0	99%
<u>FJ609815.1</u>	Escherichia coli strain 14I3 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	99%
<u>FJ609812.1</u>	Escherichia coli strain 13H1 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	99%

**MTD2**

**Sequences producing significant alignments:**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<u>AP010953.1</u>	Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome	0.0	99%
<u>FM201464.1</u>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain 9812	0.0	99%
<u>FM201463.1</u>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain B6	0.0	99%
<u>FJ609815.1</u>	Escherichia coli strain 14I3 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	99%
<u>FJ609812.1</u>	Escherichia coli strain 13H1 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	99%

**MTD3**

**Sequences producing significant alignments:**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<u>AP010953.1</u>	Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome	0.0	98%
<u>FM201464.1</u>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain 9812	0.0	98%
<u>FM201463.1</u>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain B6	0.0	98%
<u>FJ609815.1</u>	Escherichia coli strain 14I3 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	98%
<u>FJ609812.1</u>	Escherichia coli strain 13H1 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	98%

**MTD4****Sequences producing significant alignments:**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
<a href="#">AP010953.1</a>	Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome	0.0	94%
<a href="#">FM201464.1</a>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain 9812	0.0	94%
<a href="#">FM201463.1</a>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain B6	0.0	94%
<a href="#">FJ609815.1</a>	Escherichia coli strain 14I3 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	94%
<a href="#">FJ609812.1</a>	Escherichia coli strain 13H1 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	94%

**MTD5****Sequences producing significant alignments:**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
<a href="#">AP010953.1</a>	Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome	0.0	99%
<a href="#">FM201464.1</a>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain 9812	0.0	99%
<a href="#">FM201463.1</a>	Escherichia coli DNA for locus of enterocyte effacement (LEE), strain B6	0.0	99%
<a href="#">FJ609815.1</a>	Escherichia coli strain 14I3 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	99%
<a href="#">FJ609812.1</a>	Escherichia coli strain 13H1 intimin (eae) gene, eae-beta 1 allele, complete cds	0.0	99%







#### 4.3.3 Genes “housekeeping” sequenciados

Os produtos da PCR foram purificados com o Kit comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN GmgH, Hilden, Germany) e sequenciados usando os “primers forward e reverse” específicos para cada gene. Para o sequenciamento foi preparado um “Mix” contendo 200-300 ng do DNA e os “primers” específicos, na concentração de 1,6 pmol/μL.

#### 4.3.4 Análise do sequenciamento MLST

Após o sequenciamento dos sete genes e submissão das sequências ao banco de dados “MLST Databases at the ERI, University College Cork” de *E.coli*, (UCC), ST e complexos clonais foram determinados ou associados, quando possível, a algum já descrito no banco.

Os resultados obtidos revelaram a presença de dois ST novos e um complexo clonal associado. O perfil dos alelos, ST e cc, de cada uma das cepas EPEC identificadas neste estudo, podem ser observados na Tabela 5.

As cepas MTD1, MTD2 e MTD3 foram consideradas ST novos e receberam do banco de dados MLST, a identificação de ST- 2134, ST- 2147 e ST- 2134 respectivamente. A cepa MTD3 apresentou o mesmo perfil que a cepa MTD1, recebendo então a mesma identificação de ST.

A cepa MTD4 apresentou perfil compatível ao ST- 48, já descrito no banco e associado ao complexo clonal 10. De acordo com o banco de dados, antes do depósito feito a partir deste estudo não existia nenhum ST- 48 identificado em amostras de alimentos.

A cepa MTD5 foi identificada como o ST- 1717 já descrita no banco.

Para as cepas MTD1, MTD2, MTD3 e MTD5, até o momento, nenhum complexo clonal está associado.

**TABELA 5:** Perfil dos alelos, ST e cc, obtidos após o sequenciamento dos genes preconizados no MLST, das cepas EPEC isoladas

<b>cepas</b>	<i>Adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	cc
MTD1	116	4	12	16	9	7	7	2134	-
MTD2	6	241	4	8	78	8	2	2147	-
MTD3	116	4	12	16	9	7	7	2134	-
MTD4	6	11	4	8	8	8	2	48	10
MTD5	6	29	15	246	195	8	14	1717	-

ST - "Sequence types"; cc - complexo clonal

## 5. Discussão

---

De acordo com a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2002), autoridades do mundo inteiro vêm intensificando seus esforços para melhorar a segurança alimentar, entretanto, ainda hoje cepas patogênicas de *E. coli* são encontradas nos alimentos. Cerca de 630 milhões de casos de diarreia no mundo, e aproximadamente 775.000 mortes por ano, são provocadas por *E. coli* (BLANCO et al., 2006).

As linhagens isoladas neste estudo, em 100% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas, apresentaram características fenotípicas que apontavam para a identificação de *Escherichia coli*, sugerindo que as condições sanitárias deste produto possam não estar adequadas. Resultados similares foram descritos por Araújo et al. (2002) e Paneto et al. (2007), que demonstraram em suas pesquisas contaminações extremamente elevadas de *E. coli* em queijo Minas Frescal, apontando isolamento em 97 e 96% das amostras estudadas respectivamente.

Todas as cepas patogênicas de *E.coli* já foram identificadas em alimentos, porém, após um surto de DTA causado por EPEC, a presença desse micro-organismo em queijos adquiriu um significado especial (MARIER et al., 1973; PANETO et al., 2007).

Em 1988, Nascimento et al., analisando queijo Minas Frescal em Ouro Preto - MG, Brasil, já alertavam para a presença de cepas EPEC neste alimento e embora desde essa época, grandes melhorias já tenham sido observadas em relação à segurança alimentar, cepas EPEC continuam sendo isoladas deste produto, como confirmado pelo presente estudo. Resultados similares foram relatados por Gonzalez et al. (2000), Araújo et al. (2002) e Schrade e Yager (2001) entre outros.

As cinco cepas EPEC isoladas neste estudo foram provenientes de uma amostra de queijo Minas artesanal, o que corresponde a 12,5% das amostras, deste tipo de queijo, analisado.

No Brasil não existe legislação específica para a análise de queijo Minas Frescal artesanal, sendo assim as análises deste estudo foram realizadas por similaridade de produto, acatando o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.

Apesar da produção artesanal de queijo ser considerada uma importante atividade econômica, Bramley e MacKinnon (1990) alertam para o perigo da

contaminação deste alimento por micro-organismos patogênicos. Esta contaminação pode ocorrer por falhas relativas ao manejo, higiene e sanidade animal, utilização de mão-de-obra desqualificada, tratamento térmico inadequado entre outros, além da possibilidade de contaminação durante a produção e processamento dos queijos (DESCHENES et al., 1996).

Os estudos de Rocha et al. (2006) demonstraram a evolução das populações de coliformes e de *E. coli* durante o processamento dos queijos frescais no laboratório, utilizando como matéria-prima: leite B pasteurizado comercial ou leite cru. Tais resultados apontaram que bactérias potencialmente patogênicas podem multiplicar-se a níveis perigosos durante o processamento de queijo, uma vez que foram observados aumentos médios 2,5 ciclos log, para a produção de queijo a partir de leite pasteurizado, e de 4,5 ciclos log. para aqueles produzidos a partir de leite cru. Os autores reforçam a importância da fabricação de queijos utilizando como matéria-prima leite de procedência confiável, assim como a observação das determinações da legislação, para que este alimento não se torne um potencial veículo de patógenos.

Similarmente às observações feitas a partir deste estudo, Bramley e MacKinnon (1990), Furtado (1991) e Paneto et al. (2007) entre outros, apontam para a importância da qualidade do leite utilizado na produção de derivados lácteos, ressaltando que a qualidade do produto final é diretamente proporcional à qualidade da matéria prima utilizada.

Outro aspecto a ser ressaltado é a detecção da presença de cepas EPEC atípicas (AEEC), com perfil patogênico, em bovinos sadios, podendo representar um sério problema de segurança alimentar, uma vez que esses animais serão destinados à produção de carne, leite e derivados lácteos (CHINA et al., 1999; DIAS, 2007). Esses autores citam que cepas EPEC atípicas podem apresentar um perfil compatível com a virulência em animais e humanos, em função da similaridade dos marcadores fenotípicos e genotípicos detectados em seus estudos. Tais afirmações são compatíveis com os relatos de Regua-Mangia et al. (2004) e Aktan et al. (2004), que identificaram a presença de AEEC em humanos e animais, reforçando o potencial zoonótico desses agentes.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram citados por Ahmed et al. (1988) e Najand e Ghanbarpour (2006), que verificaram a presença de EPEC em amostras de queijo artesanal. Outras cepas patogênicas de *E.coli* também têm

sido reportadas nesse tipo de produto como ETEC e VETEC (PANETO et al., 2007), EAEC (SCAVIA et al., 2008) e STEC (STEPHAN et al., 2008).

Os achados deste trabalho, em concordância com relatos de pesquisadores de diferentes partes do mundo, como Araújo et al. (2002) e Planzer et al. (2009) no Brasil, Shidfar et al. (2004) e Najand e Ghanbarpour (2006) no Irã e Jayaro et al. (2006) na Pensilvânia, tornam a alertar para o perigo que representa a fabricação de queijos a partir de leite não pasteurizado; o que à luz da legislação brasileira é uma irregularidade.

Das EPEC isoladas, 40% apresentaram resistência ao antimicrobiano ampicilina e 40% perfil de resistência intermediária para a associação ampicilina-sulbactam. A elevada resistência desse micro-organismo à ampicilina já foi anteriormente descrita por autores como Baccaro et al. (2002) e Blanco et al. (2006). Entretanto, nos estudos de Dias et al. (2010), a resistência a este antimicrobiano foi de apenas 2,27%.

As cepas de *E. coli* isoladas por Paneto et al. (2007) em queijo Minas Frescal, apresentaram maior resistência à cefalotina (69%) e apenas 29% em relação à ampicilina. Neste estudo não foi observada resistência à cefalotina. Para Baccaro et al. (2002), a resistência à associação trimetoprim-sulfa (87,4%) foi similar a apresentada à ampicilina (86,8%). Assim como os autores acima citados, Costa et al. (2006) descrevem elevada resistência (73,5%) à associação trimetoprim-sulfa, fato não observado neste estudo, onde 100% das cepas foram sensíveis a estes agentes.

Diversos estudos vêm associando a produção das beta-lactamases com o aumento da resistência antimicrobiana (FERREIRA et al., 2006). Estas enzimas são capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico do antimicrobiano pela quebra da ligação amida, este então, perde a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999). As beta-lactamases podem ser detectadas em membros da família Enterobacteriaceae, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella* spp., entre outros (GARAU, 1994). Várias beta-lactamases de origem plasmidial são produzidas por patógenos Gram-negativos e hidrolizam entre outros antimicrobianos a penicilina e seus derivados como ampicilina, carbenicilina e piperacilina (LEUNG et al., 1997). Tais fatos ajudam a explicar a grande resistência encontrada frente a esses agentes.

A pressão seletiva exercida por antimicrobianos, como compostos beta-lactâmicos, está relacionada à seleção de cepas resistentes, incluindo

enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) (CHOI et al., 2008). Emery e Weymouth, em 1997, demonstraram a existência de *E. coli* produtoras de ESBL.

A associação antimicrobiana ampicilina-sulbactam tem sido considerada uma potente inibidora de beta-lactamases, o que pode vir a fazer frente a essa resistência (FERREIRA et al., 2006). Entretanto, cepas resistentes a esta associação já vêm sendo observadas, como demonstram os resultados dos estudos de Nascimento et al. (2009), onde a resistência observada a estes agentes foi de 75,6%. No presente estudo, 40% das cepas isoladas apresentaram perfil de resistência intermediário a esta associação, o que causa bastante apreensão, visto que estas cepas foram consideradas negativas para ESBL e ainda assim apresentaram certa resistência.

As enzimas,  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, são capazes de hidrolisar drogas como ceftazidima e cefotaxima. Neste estudo, observou-se 100% de sensibilidade a estes antimicrobianos, resultado já esperado, uma vez que as cepas são ESBL negativas.

Dias et al. (2010), citam que as cepas de *E.coli* apresentam grande variabilidade e segundo Gonçalves (2009) estas apresentam elevada capacidade em adquirir genes de resistência. Esta associação de fatores pode ajudar a explicar as divergências observadas nos estudos deste micro-organismo.

A utilização de métodos moleculares para identificação de micro-organismos, acompanhamento da evolução de patógenos e análises epidemiológicas têm tido cada vez mais destaque na comunidade científica.

Neste estudo, a partir da otimização da multiplex PCR as cinco cepas de *E. coli* enteropatogênica isoladas, foram genotipicamente identificadas. Esta técnica mostrou-se bastante sensível e eficaz na detecção das cepas patogênicas de *E. coli* provenientes das amostras de queijo Minas Frescal. Autores como Paneto et al. (2007) e Stephan et al. (2008) também mencionaram sucesso com o uso desta técnica.

Pesquisadores de vários países do mundo vêm obtendo sucesso com a identificação de cepas patogênicas de *E.coli* utilizando a multiplex PCR. Através desta técnica, diversas cepas patogênicas deste micro-organismo foram detectadas em amostras clínicas humanas ou animais, ambientais e alimentares. Paneto et al. (2007) isolaram cepas enterotoxigênicas em queijos feitos de leite cru no Brasil, assim como Quinto e Cepada (1997) e Vernozy-Rozand et al. (2005) que também identificaram estas cepas em queijos na Espanha e na França respectivamente.

Ainda com o uso da multiplex PCR, Dias (2007) verificou cepas EPEC atípicas em amostras clínicas de bovinos sadios no Brasil e China et al. (1999) isolaram AEEC de bovinos com ou sem sintomatologia clínica e em amostras humanas. Rúgeles et al. (2010) reportaram o isolamento de cepas STEC em carnes e vegetais, STEC, ETEC, EAEC e EPEC em amostras clínicas de crianças com diarreia e ainda EAEC em vegetais na Colômbia. Os estudos de Estrada-Garcia et al. (2009) no México, Moreno et al. (2010) no Brasil e Hien et al. (2008) na África demonstraram a detecção de cepas DAEC e EIEC através da multiplex PCR.

Tais relatos apontam que cepas patogênicas de *E.coli* frequentemente circulam entre humanos, alimentos e animais, alertando, mais uma vez, para a importância das ações de Inspeção e Vigilância Sanitária.

Tradicionalmente a classificação destas cepas patogênicas de *E.coli* é baseada nos mecanismos de patogenicidade, epidemiologia, nos sintomas clínicos das doenças que elas provocam, e mais recentemente na identificação molecular dos genes de virulência destas cepas.

Entretanto, a análise clonal destas bactérias pode fornecer informações importantes para o esclarecimento da aquisição dos fatores de virulência e o surgimento de linhagens patogênicas. Desta forma, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas e hoje conta-se com eficazes ferramentas de análise das correlações filogenéticas e avaliação epidemiológica.

Autores como Cooper e Feil (2004), Lacher et al. (2007), Afset et al. (2008) e Pitondo-Silva et al. (2009), demonstram com seus estudos que a técnica do MLST tem sido utilizada com sucesso para a determinação de ST e complexos clonais de vários patógenos. No entanto, o uso deste método molecular para caracterizar cepas de *E. coli* é recente e, principalmente, quando se trata de EPEC em alimentos os dados disponíveis nos bancos de dados são bastante escassos.

Em relação a alimentos, atualmente, existem apenas 79 registros no banco de dados MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/>) para *E.coli*. Nestes registros estão incluídas cepas patogênicas, não patogênicas e cepas identificadas como *E.coli*, porém sem informação sobre a patogenicidade. Especificamente em relação a cepas patogênicas em alimentos, somente 30 registros são observados.

Dentre os alimentos citados encontram-se carne bovina, ovina, suína e de aves, leite de cabra, mexilhão, leite cru e as cinco cepas isoladas de queijo neste estudo. De todos os registros de alimentos apenas nove são provenientes do Brasil, tendo sido quatro delas isoladas de frango, porém sem informação sobre a

patogenicidade da cepa, e as cinco cepas EPEC identificadas neste estudo. Especificamente em relação a leite e derivados lácteos, apenas oito registros são observados no total do banco de dados, três deles identificados na Inglaterra, porém sem informação sobre a patogenicidade da cepa, e os cinco registros de cepas patogênicas provenientes de queijo Minas Frescal isolados neste trabalho.

Este é o primeiro estudo do Brasil a analisar cepas patogênicas de *E.coli*, isoladas de alimentos, através da técnica MLST e o primeiro registro do banco de dados sobre *E. coli* em queijo Minas Frescal.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram a presença de dois ST novos (ST-2134, ST-2147) e dois ST já descritos no banco, ST-1717, descrito uma única vez em aves, no Chile, e ST- 48, descrito em humanos e alimentos, e associado ao complexo clonal 10 (cc10). O cc10 é o mais frequentemente descrito neste banco, compreendendo 260 isolados, que corresponde a 7,2% do total de registros. A ocorrência de cepas patogênicas de *E.coli* associadas a este complexo, em animais domésticos, humanos e alimentos é de 108 registros, sendo 103 identificados em humanos, quatro em animais domésticos (suínos e aves) isolados na Europa e apenas um em alimentos, descrito neste estudo, proveniente de queijo Minas Frescal de origem artesanal comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Destes 108 registros, 11 foram relacionados a cepas EPEC e cinco a cepas EPEC atípicas. Os dois isolados pertencentes ao ST-48 (cc10) e ST-1717 não foram associados a cepas EPEC ou EPEC atípicas constituindo assim ST únicos em relação à essas características patogênicas da *E.coli*.

Como anteriormente citado, o banco de dados de MLST de *E. coli* ainda é recente e o número de isolados e perfis depositados é pequeno. Até o momento, existem apenas registros de seis cepas EPEC em alimentos, sendo destas cinco provenientes deste estudo e uma cepa EPEC atípica identificada em suínos, na Coréia. Ampliando a margem de pesquisa, observa-se 110 registros de cepas EPEC e 65 de cepas EPEC atípicas entre amostras de alimentos, animais domésticos e humanos.

O ST-48 foi relatado sete vezes no banco de dados, e em seis delas foi associado a humanos, tendo sido identificados em Gana, Bangladesh, Nigéria e Reino Unido, e apenas uma vez em alimentos, representado pela cepa depositada a partir desta pesquisa. Dos ST-48 descritos, cepas ETEC, EAEC, EPEC e *E.coli* uropatogênica (UPEC) foram citadas.

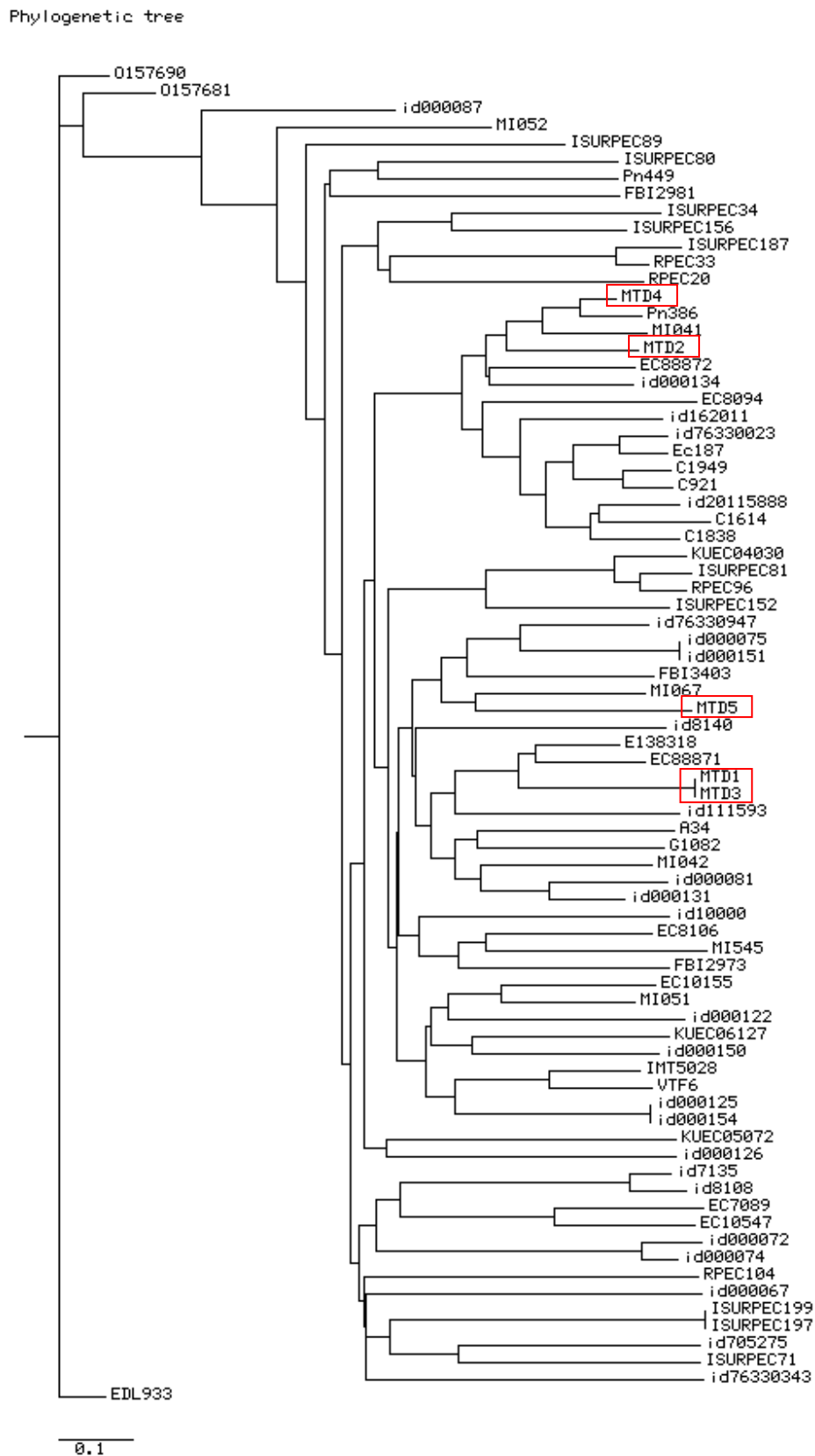


O fato de terem sido encontradas cepas EPEC pertencentes ao complexo clonal 10 e ao ST-48, previamente descritos infectando humanos, sugere a possível existência de um “link” epidemiológico entre o alimento e a infecção em humanos. Estudos complementares nesse sentido serão necessários para a confirmação dessa associação.

Para os demais ST identificados neste estudo, ST-2134 e ST-2147, ainda não foram encontrados outros registros no banco de dados MLST de *E. coli*.

O presente estudo sugere grande heterogeneidade genética entre as cepas isoladas, visto que apenas dois isolados apresentaram o mesmo ST, três isolados pertencem a um ST novo e apenas um isolado pôde ser associado a um complexo clonal já descrito. Esta heterogeneidade é consistente com a análise do banco de dados do MLST de *E. coli*, onde observa-se que das 3596 cepas depositadas, 2043 (57%) apresentaram ST diferentes, o que dá uma média de 1,7 cepas por ST até a data do fechamento deste estudo. Estes dados sugerem uma baixa clonalidade de *E. coli*, como pode ser observado na Figura 12, cujo dendograma demonstra a pouca similaridade presente entre as cepas de *E.coli*, isoladas de alimentos, depositadas no banco de dados MLST.

**FIGURA 12:** Dendograma das cepas de *E.coli*, isoladas de alimentos, depositadas no banco de dados MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/>)



Similarmente a este trabalho, os estudos de Afset et al. (2008) revelaram um perfil heterogêneo em relação às cepas EPEC atípicas provenientes de crianças norueguesas, com ou sem diarreia, uma vez que nas 56 amostras analisadas foram detectados 26 ST diferentes com 20 complexos clonais associados o que sugere uma tendência entre cepas patogênicas, ao “Linkage disequilibrium” já que não há evidência clara de recombinação genética entre os isolados. Uma revisão recente sobre a clonalidade da *E. coli* traz observações similares às aqui apresentadas (FEIL e SPRATT, 2001).

Entretanto, Lacher et al. (2007), ao estudarem a evolução das cepas típicas de EPEC, apontam que estas são mais homogêneas, contrastando com Afset et al. (2008), que mencionam não observar essa diferença entre cepas típicas e atípicas em seus estudos. Para Takahara (2004) existem dois grupos divergentes de EPEC: um grupo homogêneo quanto à sorologia e genética (contendo sorotipos de EPEC possuindo antígenos H6 e H34) e o outro grupo que é heterogêneo, abrigando outros sorotipos de EPEC e não-EPEC.

Como citado anteriormente, quando se trata da presença de EPEC em alimentos não há muitos dados disponíveis no banco de dados MLST de *E. coli*, principalmente originados do Brasil, o que dificulta a realização de uma análise molecular e epidemiológica mais ampla e detalhada.

Os dados deste trabalho apontam para a heterogeneidade e baixa clonalidade das cepas EPEC veiculadas pelo alimento analisado e para a associação destas cepas a ST específicos e a um complexo clonal associado a doenças em humanos.

## 6. Conclusões

---

As culturas isoladas neste estudo, em 100% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas, apresentaram características fenotípicas que apontavam para a identificação de *Escherichia coli*.

Os queijos tipo Minas Frescal de origem artesanal comercializados sem qualquer tipo de fiscalização na cidade do Rio de Janeiro são importantes veículos de transmissão de patógenos pertencentes à categoria enteropatogênica de *E.coli*.

A partir das amostras de queijo Minas Frescal artesanal estudadas, foram encontradas cinco cepas EPEC.

Das EPEC identificadas, 40% apresentaram resistência ao antimicrobiano ampicilina e 40% perfil de resistência intermediária para a associação ampicilina-sulbactam. Não houve caso de multiresistência nas EPEC isoladas e nenhuma delas revelou a presença de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL).

Todas as EPEC isoladas foram identificadas como cepas móveis e, portanto, não foi realizada a PCR-RFLP do gene *fliC*.

A aplicação da técnica molecular multiplex PCR, otimizada e utilizada neste estudo, apresentou-se como uma ferramenta eficaz para a identificação de cepas patogênicas de *E.coli* em queijo Minas Frescal.

O gene de virulência (*eae*) das cepas EPEC identificadas, foram sequenciados e as sequências obtidas foram depositadas no banco de dados GenBank/NCBI.

Os resultados obtidos com o uso da técnica do MLST revelaram a presença de cepas EPEC pertencentes ao complexo clonal 10, que é o mais frequentemente descrito no banco de dados MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/>) para *E.coli*.

Os dados deste trabalho apontam para a heterogeneidade das cepas veiculadas pelo alimento analisado e para a associação destas cepas a ST específicos e a um complexo clonal relacionado a doenças em humanos. O estudo do MLST sugeriu uma baixa clonalidade e ausência de recombinação genética entre as cepas analisadas.

Este é o primeiro estudo do Brasil a analisar cepas patogênicas de *E.coli*, isoladas de alimentos, através da técnica MLST e o primeiro registro do banco de dados sobre *E. coli* em queijo Minas Frescal.

## **7. Perspectivas**

---

Dar continuidade a este estudo abrangendo um maior número de amostras, de diferentes regiões, visando estabelecer correlações clínicas e epidemiológicas entre isolados alimentares, humanos e animais, inclusive caracterizando as cepas como típicas ou atípicas.

Apresentar a técnica multiplex PCR para identificação dos genes de virulência de *E. coli*, como uma realidade viável e eficaz, contribuindo com as ações de Vigilância Sanitária, a partir da perspectiva do uso desta técnica pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) dos estados, visando contribuir para futuros estudos e revisões das legislações vigentes.

No âmbito da Vigilância Epidemiológica, promover estudos sobre cepas patogênicas de *E.coli*, através do uso do MLST com uma perspectiva epidemiológica global deste patógeno, uma vez que os resultados deste estudo apontaram grande heterogeneidade das cepas e associação destas às doenças em humanos e animais domésticos. Alimentando o banco de dados para *E.coli* possibilita-se a realização de uma análise molecular e epidemiológica mais ampla e detalhada.

## **8. Considerações Finais**

---

Cabe novamente citar que alimentos de origem animal são reconhecidos mundialmente como os mais importantes na cadeia que envolve as doenças de origem alimentar. Ao identificar esses agentes nos alimentos e traçar um perfil epidemiológico das doenças infecciosas a eles associadas, dados são fornecidos para que as autoridades competentes possam elaborar medidas de controle apropriadas.

Estudos mostram que mudanças simples nas questões higiênico-sanitárias trazem resultados significativos na qualidade dos alimentos, conseqüentemente minimizando a possibilidade de veiculação de patógenos pelos mesmos e colaborando para diminuir o risco de agravos à saúde da população.

A comercialização de leite e derivados lácteos, sem que haja qualquer tipo de fiscalização, é uma realidade que deixou de ser típica do interior dos estados e hoje invade as ruas, feiras e pequenos comércios da cidade do Rio de Janeiro. Embora não haja autorização legal para tal prática, pessoas estão consumindo esses produtos e muitas vezes adoecendo. Vale lembrar que a notificação de casos e surtos de DTA, causados pelo consumo de produtos artesanais ou não, é contabilizada no quadro estatístico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Sugere-se que ações integradas entre os órgãos de pesquisa, fiscalização e extensão, associadas a efetivas políticas públicas, possam realmente fazer da produção de leite e derivados lácteos, tanto em escala industrial quanto familiar, uma atividade viável, segura e sustentável.

## Referências

---

ACHESON, D. W. K. Foodborne infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, n.15, p.538, 1999.

ADACHI, J. A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p.1706-1709, Jun. 2001.

ADACHI, J. A. et al. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. **The Journal Infectious Diseases**, v.185, n. 11, p. 1681-1683, Jun. 2002 a.

ADACHI, J. A.; MATHEWSON, J. J.; JIANG, Z-D.; ERICSSON, C. D.; DuPONT, H. L. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. **Annals of Internal Medicine**, v.136, n. 12, p. 887-897, Jun. 2002 b.

AFSET, J. E. et al. Phylogenetic Backgrounds and Virulence Profiles of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from a Case-Control Study Using Multilocus Sequence Typing and DNA Microarray Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2280–2290, 2008.

AHMED, A.; AHMED, H.; MOUSTAFA, K. Occurrence of fecal coliform and enteropathogenic *Escherichia coli* (EEC) in Egyptian soft cheese. **Journal of food protection**, v. 51, n. 6, p. 422-443, 1988.

AKTAN, I. et al. Characterization of attaching effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1-2, p. 43–53, 2004.

ALMEIDA, P.M.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora da lesão “attaching and effacing” (AEEC) isoladas de cães na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro**. Niterói, 2005. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

AMHAZ, J. M. K. et al. Molecular typing and phylogenetic analysis of enteroinvasive *Escherichia coli* using the *fliC* gene sequence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235 p. 259–264, 2004.

ANONYMOUS. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2002. **Health Canada**, Ottawa, Canada., 2004.

ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145-150, 2007.



- ARAÚJO, V. S. et al. Occurrence Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p. 1172-1177. 2002.
- ATLAS, R. M; BEJ, A. K. Polymerase Chain Reaction. In: Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. (eds), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. **American Society for Microbiology**. p 418-435, 1994.
- BACCARO, M. R. et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.
- BANATVALA, N. et al. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. **The Journal Infectious Diseases**, v. 183, p.1063-1070, 2001.
- BAKER, M. et al. Emergence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in New Zealand. **New Zealand Public Health Report**, v. 6 n. 2, p. 9-16, Feb. 1999.
- BARROS, P. O. G. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.18, n.122,p.57-66, 2004.
- BALDINI, M. M. et al. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 2, p. 534-538, 1983.
- BEATTY, M.; ADCOCK, P.; SMITH, S. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.329-34, 2006.
- BEEBAKHEE, G. et al. Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. **FEMS Microbiology Letters**, v.91, p. 63-68, 1992.
- BERN, C. et al. The magnitude of the global problem of diarrhoeal diseases: A ten-year update. **Bulletin of the World Health Organization**, v.70, p. 705-714, 1992.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; Le BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p.4302-4311, 2002.
- BERTIN, Y. et al. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3060-3065, 2001.
- BEUTIN, L. et al. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) - producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31,p. 2483-2488, 1993.
- BLANCO, M. et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v.54 p. 309-319, 1997.

BLANCO, J. et al. ***Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animals, - Laboratorio de referencia de *E. coli* (LREC)**. Disponível em <[www.lugo.USC.ES/ecoli/E.coli.html](http://www.lugo.USC.ES/ecoli/E.coli.html)> Acesso em: 15 jan. 2006.

BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v.277, p. 1453-1462, 1997.

BOERLIN, P. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance in veterinary medicine: where do we go? **Animal Health Research Reviews**, v. 5, p.95–102, 2004.

BOTELHO, B. A. et al. Identification of EPEC and non-EPEC serotypes in the EPEC O serogroups by PCR-RFLP analysis of the *fliC* gene. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 87–93, 2003.

BOURGEOIS, C. M., MESCLE, J. F., ZUCCA, J. **Microbiologia Alimentaria**. Vol. 1 Aspectos Microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria , 1 ed. Zaragoza (Espanha): Editorial Acribia SA, 1994. 437 p. Tradução de Victor A. Diez Fernandes.

BOYCE, T. G.; SWERDLOW, D. L.; GRIFFIN, P. M. Current concepts: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. **New England Journal of Medicine**, v.333, p.364-368, 1995.

BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. Dairy microbiology: the microbiology of milk. 2 ed. London/New York: **Elsevier Science Ltda**, p.163-207, 1990.

BRANDAL, V. et al. Octaplex PCR and fluorescence- based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 2, p. 331-341, 2007.

BRASIL. Decreto Nº 5.839, de 11 de julho de 2006. Dispõe sobre a organização, as atribuições e o processo eleitoral do Conselho Nacional de Saúde - CNS e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jul., 2006.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990a. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 dez., 1992. Seção 1, pt.1.

\_\_\_\_\_. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990b. Código de Defesa do Consumidor. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v.128, n 176, supl., p.1, 12 set., 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço de Inspeção do Produto Animal estabeleceu **Parâmetros microbiológicos, através da informação DIPES nº 097/88, para as águas das áreas de extração, criação e manutenção dos moluscos bivalvos e que serão consumidos crus**, Brasília, DF, 1988.

\_\_\_\_\_. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília, 1974.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, 08 set., 1997, 3 p.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, 20 set., 2002, Seção 1, Página 13.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa Nº 62, 26 ago. 2003a. Regulamentos Técnicos – Oficializa os métodos analíticos oficiais microbiológicos para controle dos produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set., 2003, n.181, p.14, Seção1.

\_\_\_\_\_. Resolução DIPOA/SDA Nº 10, DE 22 DE MAIO DE 2003b. Institui o Programa Genérico de PROCEDIMENTOS - PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL - PPHO, a ser utilizado nos Estabelecimentos de Leite e Derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 mai., 2003, Seção 1, Página 4.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução. CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 53, 18 mar, 2005, Seção1, Páginas 58-63.

BRASIL. Ministério da Saúde. Norma Operacional Básica do Sistema Único de Saúde/NOB-SUS 96 - “Gestão plena com responsabilidade pela saúde do cidadão”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 nov., 1996.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 jan., 2001. Seção 1, pt.1.

BUCHANAN, R. L.; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Foodtechnology**, v. 51, n. 10, p. 69-75, Oct. 1997.

CAMPOS, L. C. et al. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infection and Immunity**, v. 62, p.3282– 3288, 1994.

CANTARELLI, V. et al. Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.266-270, 2000.

CARMO, G. M. I. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2008**. Disponível em <[http://www.google.com.br/#hl=pt-BR&source=hp&biw=1138&bih=544&q=coveh+svs+ms&oq=coveh+&aq=1&aqi=g2&aql=&gs\\_sm=c&gs\\_upl=11321126951016101111013121136212-3.2&bav=on.2,or.r\\_gc.r\\_pw.&fp=54c3f48c6c77a6f1](http://www.google.com.br/#hl=pt-BR&source=hp&biw=1138&bih=544&q=coveh+svs+ms&oq=coveh+&aq=1&aqi=g2&aql=&gs_sm=c&gs_upl=11321126951016101111013121136212-3.2&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.&fp=54c3f48c6c77a6f1)> Acesso em: 15 abr. 2010.

CARVALHO, E. P. et al. Qualidade do queijo "Minas frescal" comercializado em feiras livres. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 14, Juiz de Fora, 1996. **Anais...**, Juiz de Fora, p.111-118, 1996.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de *salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, 1999. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67\\_1/pesquisa\\_salmonella.htm](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_1/pesquisa_salmonella.htm) Acesso em: 03 abr 2011.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997– 2001. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.123, p.49-53, 2004.

CAUGANT, D. A.; LEVIN, B. R.; SELANDER, Y. R. K. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. **Genetics**, v. 98, p. 467-490, 1981.

CAUGANT, D. A. et al. Genetic diversity and relationships among strains of *Escherichia coli* in the intestine and those causing urinary tract infections. **Progress in Allergy**, v. 33, p. 203-227, 1983.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drink unpasteurized commercial apple juice – British Columbia, California, Colorado and Washington, October 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 45, p. 975, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella surveillance**: annual summary, 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004.

CERQUEIRA, A. M. F. et al. 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.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p.2138-2140, May 2003.

CHINA, B. et al. Comparasion of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human "attaching and effacing" *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v.178, p. 177-182, 1999.

CHOI, S. H. et al. Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by *Enterobacteriaceae* producing AmpC  $\beta$ -lactamase: implications for antibiotic use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 995-1000, 2008.

CHOPRA, I., ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.232–260, 2001.

CHUC, N. T. et al. Improving private pharmacy practice: a multi-intervention experiment in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 55, p. 1148-1155, 2002.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*—an emerging problem? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.41, p. 93–98, 2001.

CLARKE, S. C. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects. **British Journal of Biomedical Science**, v. 59, n. 2, p. 123-127, 2002.

CLARKE, S. C. et al. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 365-378, Jul. 2003.

COIMBRA, R. S. et al. Clonal relationships among *Shigella* serotypes suggested by cryptic flagellin gene polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.670–674, 2001.

COLEN, G. et al. Avaliação microbiológica do leite tipo C e queijo tipo "Minas" comercializados em Belo Horizonte In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 7, Juiz de Fora, 1996. **Anais...**, s.p. 1984.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing – what is resolved? **Trends Microbiology**, v.12, n.8, p.373-377, 2004

CORREA, W. M.; CORREA, C. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, p.178-79.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil fil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 5-8, 2006.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, n. 1, p. 105-114, jan-jun, 2007.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DANIELS, N. A. et al. Traveler's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.1491-1495, 2000.

DANIELS, N. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Traveler's Diarrhea Comes Home. **Editorial Commentary**, v. 42 , p. 335 1 Feb., CID 2006.

DE BUYSER, M.L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

DECKERT, G. et al. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 353-358. 1998.

DESCHENES, G. et al. Cluster of cases of hemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. **Pediatric Nephrology**, v. 10, p. 203-205, 1996.

DEVASIA, R. A.; JONES, T. F., WARD, J. Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxin producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. **American Journal of Medicine**, v. 119, p. 168, 2006.

DE VINNEY, R. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2389-2398, 1999.

DONNENBERG, M. S., KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 3953-3961, 1992.

DIAS, M. T. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora da lesão “attaching and effacing” (AEEC) isoladas de amostras fecais de bovinos sadios.** Niterói, 2007, 80p. Dissertação (Mestre em clínica Veterinária – área de concentração microbiologia), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF).

DIAS, M. T. et al. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) à antimicrobianos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 319-324, 2010.

DIAS, R. S. et al. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8, Juiz de Fora, 1996. **Anais...**, 1995, p.143-144.

DUGUID, J. P.; MARMION, B. P.; SWAIN, R. H. A. **Mackie and McCartney Medical Microbiology.** Churchill Livingstone: Edinburgh, 1978.

DUQUE, S. D. S. et al. Primary fecal culture used as template for PCR detection of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence factors. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 241-246, 2002.

DURRER, P. et al. Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus-infected persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 5, p. 1540-1544, Nov. 2000.

ELLIOTT, E. J. et al. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological and epidemiological features. **Archives of Disease in Child-Hood**, v. 85, n. 2, p. 125-131, 2001.

EMPRESA DE ASSISTENCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade. **Revista da EMATER – MG**, Muzambinho, v. 22, n. 80, p. 8-9, ago. 2004.

EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. Detection and clinical signification of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Tertiary Care medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.8, p. 2061-2067, 1997.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA - EPAGRI. **Manual do cultivo do mexilhão Perna perna**. Florianópolis, 1994. 140 p.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol**, v.7, p.482-487, 1999.

ERLICH, H.A. PCR: technology: principles and applications for DNA amplification. New York/Oxford: **Oxford University Press**, 1992.

ESTRADA-GARCÍA,T. et al. Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*,Mexico. **Emerging Infectious Diseases** • www.cdc.gov/eid • v.11, n. 8, 2005.

ESTRADA-GARCÍA,T. et al. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 93-98, 2009.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F. Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p.49-57, 2003.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae***. 4.ed., Elsevier Science Publishers, New York, NY, 1986.

FEIL, E. J.; SPRATT, B. G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 561-590, 2001.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Bacteriological analytical manual *online*, 8<sup>th</sup> Edition, Revision A, 2002. Chapter 4. Disponível em <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. Acesso em 01 Set. 2003.

FERREIRA, J. B. et al. Eficácia e segurança de Sultamicilina (Ampicilina/Sulbactam) e Amoxicilina/ Clavulanato no tratamento das infecções de via aéreas superiores em adultos – um estudo multicêntrico, aberto e randomizado. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.72, n.1, p. 104-11, 2006.

FIELDS, P. I. et al. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and a development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1066–1070, 1997.

FINLAY, B.B., VALLANCE, B.A. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America of the United States of America**, v. 97, p. 8789-8806, 2000.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados**. Roma, 1994. (informe de un Comité mixto FAO/OIEA/OMS de expertos).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual *Online*. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov>.> Acesso em: 10 de out. 2003.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: Focus on infection. **American Journal Epidemiology**, v.153, n.12, p.1135-1141, 2001.

FRANCO, B. D. G. M. Métodos de Análise. In: FRANCO, B.D.G.M. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 10, p. 165 -176.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap.4, p. 33-81.

FRANKEL, G. et al. The cell-binding domain of intimins from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to  $\beta$ 1 integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 20359-20364, 1996.

FREITAS, A.C. et al. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection** v.5, p. 62-65. 1993.

FRIEDRICH, A. W. et al. *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.74-84, 2002.

FUENTE, R. et al. Prevalence and characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy sheep and goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 2, p. 262-266, 2002.

FUKUTA, S. et al. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. **Infection and Immunity**, v. 56, p.1748-1753, 1988.

FURTADO, M. M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. 2 ed. São Paulo: Globo. 1991.

GARAU, J. Beta-lactamases: current situation and clinical importance. **Intensive Care Medicine**, v. 20, p. 95-99, 1994.

GERBER, A. et al. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 493-500, 2002.



GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções In: **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Germano, P. M. L. e Germano, M. I. S. São Paulo: Varela, p.217-222, parte 12, 2001.

GOLDBERG, M. B.; SANSONETTI, P. J. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4941-4946, 1993.

GOMES, T. A. T. et al. Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.160, p 131-135, 1989.

GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GONÇALVES, F. A. et al. Antibacterial activity of guava, *psidium guajava* linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 11-15, 2008.

GONÇALVES, A. F. **Análise molecular da resistência a antibióticos, factores de virulência e grupos filogenéticos em *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. de animais**. Vila Real, 2009, 95 p. Dissertação (Mestre em Biologia clínica Laboratorial), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

GONZALEZ, A. G. M. et al. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 321–328, 2000.

GORDILLO, M. E. et al. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.889–893, 1992.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Review**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUERRANT, R. L. et al. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12 (Suppl. 1), p. S41–S50, 1990.

GUTH, B. E. C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* - An Overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Suppl. I, v. 95, p. 95-97, 2000.

HARRIS, J. R. et al. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. **American Journal of Epidemiology**, v. 122, p. 245-252, 1985.

HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 13, n. 2, 121-131, 1993.

HIEN, B. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains Isolated from Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, v. **46**, n. **3**, p. **996-1004**, **2008**.

HICKS, S. et al. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infection and Immunity*, v.66, p.1570-1578, 1998.

HIGGINS, L. M. et al. Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Nature*, v. 285, p. 588-591, 1999.

HILBORN, E. D. et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine*, v. 159, n. 15, p. 1758-1764, 1999.

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODD, E. C. D. Coliforms – *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C., SPLITSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological of Foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. **9 ed.:** **Lippincott Williams & Wilkins**, 1994.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging enteric pathogen. *American Journal of Gastroenterology*, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

HUANG, D. B.; DuPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 15, p. 266-271, 2004.

HUILAN, S. et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 69, p. 549-555, 1991.

IBGE. Diagnóstico da Cadeia Produtiva do Leite do Estado do Rio de Janeiro: **Produção de Leite no Brasil, no Estado do Rio de Janeiro e nos Principais Municípios Produtores em 2002 e 2008**. Rio de Janeiro, FAERJ/SEBRAE, 2010. Cap. 1, p. 9-13.

INMETRO. LEITE Tipo "B", Tipo "C", UHT e Queijo Minas Frescal e Prato. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/leitequeijo.asp>> Acesso em: 03 nov. 2009.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria Nº 818, de 12 de dezembro de 2006**. Regulamento Técnico de Produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2006. p. 4.

\_\_\_\_\_. **Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002**. Dispõe sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas na Manipulação e Fabricação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2002. p. 14.

ITOH, Y. et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2546-2550, 1997.

ISTOCK, C. A. et al. Sexuality in a natural population of bacteria - *Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 95-103, 1992.

JAKABI, M., FRANCO, B. D. G. M. Frequência de isolamento de cepas de *Escherichia coli* patogênica em alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.11, p.170-181, 1991.

JAYARO, B. M. et al. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farms families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451–2458, 2006.

JIANG, Z. D. et al. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregativa *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4185-4190, 2002.

JORES, J., RUMER, L., WIELER, L. H. Impact of locus of enterocyte affacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 103-113, 2004.

KALMAN S. et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. **Nature Genetics**, v. 21, p. 385-389, 1999.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, p. 123-139, 2004.

KAPER. J. B. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of shiga toxin-producing *Escherichia coli* 157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 51, p. 101-107, 1996.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**. v. 91, p. 511-520, 1997.

KHAN, S. Gene to ultrastructure: the case of the flagellar basal body. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2169-2174, 1993.

KITCHEN, B. J. Reviw of the process of dairy science: bovine mastitis: milk composition changes and relatedes diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p.167-188, 1981.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico. 5.ed., Rio de Janeiro: **MEDSI**, 2001. 1465p.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 775-779, 1977.

KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1290-1298, 1989.

KNUTTON, S. et al. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 365-371, 1991.

KNUTTON, S. et al. A novel *EspA*-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p.165–170, 1983.

LACHER, D. W. et al. Molecular Evolution of Typical Enteropathogenic *Escherichia coli*: Clonal Analysis by Multilocus Sequence Typing and Virulence Gene Allelic Profiling. **Journal of Bacteriology**, v.189, n. 2, p. 342–350, 2007

LAN, R. et al. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella spp.*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5080-5088, 2004

LAWRENCE, J. G.; OCHMAN, H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 95, p. 9413-9417, 1998.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76. 2003.

LEUNG, M.; SHANNON, K.; FNENCH, G. Rarity of transferable  $\beta$ -lactamase production by *Klebsiella* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherap**, v. 39, p. 737-745, 1997.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropatogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and patho-genesis. **Epidemiologic Review**, v. 6, p. 31-51, 1984.

LEVINE, M. M. et al. Pediatric diarrhea: the challenge of prevention. **Pediatric Infectious Disease**, v. 5 (Suppl.), p. 29-43, 1986.

LOGAN, N. A. Bacterial systematics. **Blackwell scientific publications**, Oxford, 263 p. 1994.

LÓPEZ-SAUCEDO, C. et al. Single multiplex polimerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 127-131, 2003.

MAC DONALD, K. L. et al. A multistate outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* imported semisoft chesse. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 4, p. 716-720, 1985.

- MACÊDO, N. R. et al. Epidemiologia molecular de *Haemophilus parasuis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.8, p.2576-2582, nov, 2009.
- MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 535–546, 2000.
- MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.
- MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.39-48, 2003.
- MANDIL, A. et al. *Staphylococcus aureus* em queijos "tipo Minas". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 233-241, 1982.
- MARIER, R. et al. An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* food borne disease traced to imported fresh cheese. **Lancet**, v. 2, p. 1376-1378, 1973.
- MARQUES, H. L. A.; PEREIRA, R. T. L. **Mexilhões biologia e criação**. São Paulo: Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária, 1988. p. 32. Boletim Técnico, 12.
- MARTIN, W. Mosaic bacterial chromosomes: a challenge en route to a tree of genomes. **BioEssay**, v. 21, p. 99-104, 1999.
- MARTINEZ, A. J. et al. Characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 70, n.12, p. 2843-2846, 2007.
- MC DANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.
- MEAD PF, SLUTSKER L, DIETZ V. Foodrelated illness and death in the United States. **Emerg Infect Dis**. v.5, p.607–25, 1999.
- MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.
- MOREIRA, C. N. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 179-183, 2003.
- MORENO, A. C. R.; GUTH, B. E. C.; MARTINEZ, M. B. Can the *fliC* PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Technique Replace Classic Serotyping Methods for Characterizing the H Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p.1453–1458, 2006.
- MORENO, A. C. R. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

MUSSER, J. M. et al. Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 52, p. 183-191, 1986.

NAJAND, L. M.; GHANBARPOUR, R. A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. **Veterinarski Arhiv**, v. 76, n. 6, p. 531-536, 2006.

NASCIMENTO, D.; SABIONI, J. G.; PIMENTA, N. Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasora (EIEC) em queijo tipo Minas-Frescal da cidade de Ouro Preto. **Revista de Microbiologia**, v.19, p. 258-61, 1988.

NASCIMENTO, T. C. et al. Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 415-419, 2009.

NATARO, J. P. et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **Journal of Infectious Diseases** v.171, p.465-468, 1995.

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

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 251-261, 1998.

NATARO, J. P. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402-407, 2006.

NEIDHARDT, F. C. et al. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. **American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA.** 1987.

NEIDHARDT, F. C. et al. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. **American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA.** 1996.

NGUYEN, T. V. et al. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 43, n. 2, p.755-760, 2005.

O'BRIEN, B. et al. Influence of somatic cellcount and storage interval on composition and processing characteristics of milk from cows in late lactation. **Australian Journal of Dairy Technolgy**, v. 56, n.3, p. 213-218, 2001.

OCHOA, T. J.; CLEARY, T. G. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. Current Opinion in **Infectious Diseases**, v.16, p.259-263, 2003.

OLVERA, A; CERDA` - CUE`LLAR, M.; ARAGON, V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. **Microbiology**, v. 152, n.12, p. 3683-3690, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO global strategy for food safety: safer food for better health.** (Food safety issues), 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Food Safety and Foodborne Illness.** Disponível em: < <http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html> >. Acesso em: 29 de set. 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. STATE of the art of new vaccines: research & development / Diarrhoeal diseases. **World Health Organization.** Genebra, 2005. Disponível em [http://www.who.int/vaccine\\_research/documents/new\\_vaccines/en/index1.html](http://www.who.int/vaccine_research/documents/new_vaccines/en/index1.html). Acesso em 30 de Junho de 2005.

OSWALD, E. et al. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 64 -71, 2000.

PANETO, B. R. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo minas frescal no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.

PARKHILL J. et al. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. **Nature**, v. 404, p. 502-506, 2000.

PERNA, N. T. et al. Molecular evolution of a pathogenic island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3810-3817, 1998.

PICKERING, L. K.; OBRIG, T. G.; STAPLETON, F. B. Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Pediatric Infectious Disease**, v. 13 p. 459-476, 1994.

PITONDO-SILVA, A. et al. Clonal relationships determined by multilocus sequence typing among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, n.6, p. 672-679, 2009.

PLANZER JR, S. B. et al. Food Safety Knowledge of Cheese Consumers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.

PRAGER, R. et al. Subtyping of pathogenic *Escherichia coli*, strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 477-486, 2003.

QUINTO, E. J.; CEPEDA, A. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft chesse made with raw or pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 291-295, 1997.

RATCHTRACHENCHAI, O. A.; SUBPASU, S.; ITO, K. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. **Bulletin of Department of Medical Sciences**, v. 39, p. 211-220, 1997.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro. Brazil. **Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 161–167, 2004.

REID, S. D.; SELANDER, R. K.; WHITTAM, T. S. Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 153–160, 1999.

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

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype O157:H7. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 681-685, 1983.

RIO DE JANEIRO (Estado). Decreto nº 38.757, de 25 de janeiro de 2006. Aprova o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Disponível em: <[http://www.agricultura.rj.gov.br/pdf/decreto/DECRETO\\_38%20757\\_APROVA%20O%20REGULAMENTO%20DA%20INSPECAO%20INDUSTRIAL.pdf](http://www.agricultura.rj.gov.br/pdf/decreto/DECRETO_38%20757_APROVA%20O%20REGULAMENTO%20DA%20INSPECAO%20INDUSTRIAL.pdf)> Acesso em: 11 fev. 2011.

RIO DE JANEIRO (Estado). 'Boom' na pecuária de leite no Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://riodejaneiro.vilablog.com/2010/08/12/boom-da-pecuaria-leiteira-no-estado-do-rio-de-janeiro/>> Acesso em: 11 fev. 2011.

RIVAS, M. Characterization and Epidemiologic Subtyping of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Hemolytic Uremic Syndrome and Diarrhea Cases in Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, 2006.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006

ROCHA, M. Plásmidos en *Escherichia coli* y su importancia en la evolución de la patogénesis. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, **Universidad Nacional Autónoma de México**, v. 69, 1999.

RODRIGUES, F. T. et al. Características do queijo tipo Minas frescal comercializado em Viçosa-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8, Juiz de Fora, 1995. **Anais...**, Juiz de Fora, 1995, p.233-235.

ROOS, T. B. et al. Avaliação microbiológica de queijo colônia produzido na cidade de Três Passos, RS. **Higiene Alimentar** São Paulo, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

RÚGELES, L. C. et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n.3, p. 282-286, 2010.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, p. 458-461, 1988.



SADER, H. S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.1, 2004.

SANDERS, T. A. B. Food production and food safety. **British Medical Journal**, n. 318, p. 1689-1693, 1999.

SANSONETTI, P. J. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 180, p. 1-19, 1992.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTOS, E. S.; GENIGEORGIS, C.; FARVER, T. B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. **Journal of Food Protection**, v. 44, p. 172-176, 1981.

SATCHER, D. Food safety: a growing global health problem. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, p. 1814-1817, 2000.

SELANDER, R. K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 873-884, 1986.

SCAVIA, G. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SCHRADE, J. P.; YAGER, J. Implication of milk and milk products in food disease in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 1-17, 2001.

SCHROEDER, C. M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 576-581, 2002.

SCOTLAND, S.M. et al. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, p. 1069-1074, 1990.

SETHABUTR, O. et al. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 458-461, 1993.

SHAW, K. J. et al. Molecular genetic of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Microbiological Reviews**, v. 57, p. 138-163, 1993.

SHIDFAR, R. F. et al. A survey on Aflatoxin M1 and Bacterial contamination on domestic Iranian cheese in Ilam from 2002 to 2004. **National Congress on Food Hygiene and Safety**. 21-23 Dec. Yazd, Iran. 2004

- SILVA, C. A. B.; FERNANDES, A. R. Projetos de empreendimentos agroindustriais. Viçosa: **Editora UFV**, v. 1. Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SILVA, C. A. M.; LEITÃO, M. F. F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo “Minas Frescal”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro. Programa Oficial, **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p.186.
- SILVA, R. M.; TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 441-444, 1980.
- SILVA, S.; SOUZA, C. Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal comercializado na cidade de Belém - Pará. **Laboratório Central do Estado do Pará-Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará**, 2006.
- SILVA, W. P. Segurança Alimenar. XV Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa, 2010. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br> Acesso em: 15 de janeiro de 2011.
- SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.6, p.1340-1347, nov./dez., 2003.
- SKOŁD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary Research**, v. 32, p. 261–273, 2001.
- SMITH, H.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T. *E. coli* as a cause of outbreaks of diarrhoeal disease in the UK. **Microbiology Today**, v. 31, p. 117-118, 2004.
- SOUZA, V. M. et al. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3373-3385, 1999.
- SPHIGEL, N.Y. et al. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 1. p. 60-65, 2008.
- STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 88–96, 1998.
- STEPHAN, R. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 7, p. 2561-2565, 2008.
- STONE, K. D. et al. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus **Molecular Microbiology**, v. 20,p. 325-337, 1996.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. Molecular typing methods. In: ERSING, D. H. et al. **Diagnostic molecular microbiology**. Principles and applications. Washington, D.C., ASM Press p.26-50, 1993.

SWERDLOW, D. L. et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, p. 812-819, 1992.

TAKAHARA, S. Y. B. Avaliação da diversidade genética e análise filogenética de *Escherichia coli* diarreogênicas usando RAPD e MLST. 2004. 124 f. Tese (Doutorado) - **Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Ciências Biomédicas**.

TARTOF, S. Y. et al. Analysis of a Uropathogenic *Escherichia coli* Clonal Group by Multilocus Sequence Typing **Journal of clinical microbiology**, v.43, n.12, p. 5860–5864 Dec. 2005,

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 31-41, 2002.

TOLLEFSON, L.; FLYNN, W. T.; HEADRICK, M. L. 2003. Regulatory activities of the U.S. Food and Drug Administration designed to control antimicrobial resistance in foodborne pathogens, p. 57–63. In M. E. Torrence and R. E. Isaacson (ed.), **Microbial food safety in animal agriculture**. Iowa State Press, Ames, IA.

TODD, E.C. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. **World Health Statistics Quarterly**, v. 50, p. 30-50, 1997.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669–2671, 2003.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TRABULSI, L. R. et al. Microbiologia. **Editores Atheneu**, 4<sup>o</sup> Ed., 269-310, 2004.

UGRINOVICH, L. A. et al. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 289-291, 2002.

VALENTE, A. M. **Efeito da irradiação sobre mexilhões [Perna perna (Linnaeus 1758)]**: Coliformes termotolerantes e Enterococcus; ação antimicrobiana e análise Sensorial das amostras. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói –RJ.

VAN DEN BOGAARD, A. E. et al. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 763-771, 2001.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. 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.

VIBOUD, G. I. et al. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2829-2833, 1999.

VIDAL, M. Single Multiplex PCR Assay to Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5362-5365, 2005.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2567-2570, 1996.

WANG, L. et al. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1786-1790, 2000.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 4–8, 2007.

WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p. 3-7, 1999.

WOOD, P. C. **Manual de higiene de los mariscos**. Zaragoza: Acribia, 1996.

YAMASAKI, S. et al. Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly - and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. **Microbiology and Immunology**, v. 40, p. 345–352, 1996.

YU, J; KAPER, J. B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 411-417, 1992.

ZHANG, W.L. et al. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2989–2993, 2000.

## **Apêndices**

---

### **Apêndice 1:**

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA; L. A. T.; MARIN, V. A. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna linnaeus*, 1758) à antimicrobianos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, n.2, p. 319-324, abr.-jun. 2010

### **Apêndice 2:**

DIAS, M. T.; MARIN,V. A. Isolamento, caracterização genotípica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de capas enteropatogenicas de *E.coli* (EPEC), isoladas de queijo Minas Frescal. (Artigo submetido à revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, em janeiro/2011, sob o código: 5208)

### **Apêndice 3:**

DIAS, M. T.; MARIN,V. A. Isolamento e caracterização genotípica de cepas patogênicas de *E.coli* isoladas de Queijo Minas Frescal no Município do Rio de Janeiro. (Trabalho apresentado no V Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária – SIMBRAVISA 2010, realizado entre 13 e 17 de novembro de 2010 em Belém - Pará).

## Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna linnaeus*, 1758) à antimicrobianos

*Evaluation of antimicrobial sensitivity of Escherichia coli strains isolated from mussels (Perna perna linnaeus 1758)*

Mariana Tavares DIAS<sup>1\*</sup>, Paulo César Rocha Ferreira SANTOS<sup>2</sup>,  
Luiz Antônio Trindade OLIVEIRA<sup>2</sup>, Victor Augustus MARIN<sup>3</sup>

### Resumo

Foram avaliadas 44 cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras cárneas de mexilhões capturados no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, quanto a sua sensibilidade a antimicrobianos. Vinte e quatro antimicrobianos foram testados e padrões variáveis de comportamento frente aos mesmos foram observados. Todas as cepas avaliadas apresentaram sensibilidade total a apenas 41,66% dos antimicrobianos (R, Ac, C, To, Fx, Cz, Ct, Nt, Cp, Ge) e resistência total a 4,16% dos antimicrobianos (Ca). A cepa número 18 apresentou sensibilidade a 95,83% dos antimicrobianos, enquanto que a cepa número 30 aduziu resistência a 41,66% dos antimicrobianos. Frente aos resultados obtidos é importante ponderarmos sobre o risco à Saúde Pública associado ao hábito de ingerir pescado cru ou insuficientemente cozido, especialmente bivalves filtradores contaminados por bactérias com comprovada resistência a diferentes antimicrobianos, alimentos potencialmente envolvidos em processos de reinfecção do homem, no qual desencadeiam quadros de gastroenterite.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; sensibilidade antimicrobiana; mexilhões.

### Abstract

Forty-four strains of *Escherichia coli* isolated from mussel samples collected in the city of Niterói, State of Rio de Janeiro, were evaluated in terms of antimicrobial sensitivity. Twenty-four antimicrobials were tested, and different standards of behavior could be observed. All strains evaluated presented total sensitivity to only 41.66% of the antimicrobials (R, Ac, C, To, Fx, Cz, Ct, NT, Cp, and GE) and total resistance to 4.16% of the antimicrobials (Ca). The strain number eighteen presented sensitivity to 95.83% of the antimicrobials, whereas the strain number thirty presented resistance to 41.66% of the antimicrobials. Based on the results obtained, it is important to consider the health risk posed by raw fish consumption, especially filter-feeding bivalves, contaminated by microorganisms resistant to different antimicrobials since they may be involved in processes of human reinfecção causing gastroenteritis.

**Keywords:** *Escherichia coli*; antimicrobial sensitivity; mussel.

## 1 Introdução

Vários capítulos da história da microbiologia retratam o duelo que o homem vem travando com microrganismos que apresentam resistência a substâncias que lhes deviam ser nocivas.

Em 1935, Gerhard Domagk descobriu a substância Prontosil, que ingerida ou injetada eliminava o *Streptococcus* spp. em ratos. Essa informação levou à descoberta de substâncias similares, conhecidas como sulfanilamidas. Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina, que em 1942 viria a ser usada em seu paciente Harry Lambert, acometido por uma cepa de *Streptococcus* spp. resistente às sulfas (EXLEY, 1990).

Nos tempos modernos, uma das grandes preocupações da comunidade científica é a grande probabilidade de colonização da mucosa intestinal do homem, através da ingestão de alimentos

contaminados, por microrganismos extremamente resistentes à maioria dos antimicrobianos utilizados no tratamento de enfermidades.

O uso de antibióticos foi revolucionário no tratamento das infecções bacterianas e crucial para a redução da mortalidade (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, seu uso abusivo e indiscriminado, tanto em humanos (CHUC et al., 2002) quanto na medicina veterinária (COSTA et al., 2006), pode ter contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana (CHUC et al., 2002). Essa resistência relaciona-se, ainda, à produção de enzimas ( $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases de amplo espectro), que atuam sobre a estrutura das penicilinas, inativando-as, característica que constitui um mecanismo de defesa desses agentes. Emery e Weymouth (1997) constataram que a síntese dessas enzimas era codificada por genes presentes

Recebido para publicação em 20/4/2008

Aceito para publicação em 3/11/2009 (003314)

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz/MS, Av. Brasil, CEP 21040-900, CP 4365, Manguinhos - RJ, Brasil,

E-mail: marianatdias@click21.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense - UFF, Rua Vital Brasil Filho, 64, CEP 24320-340, Santa Rosa, Niterói - RJ, Brasil

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz/MS, Av. Brasil, CEP 21040-900, CP 4365, Manguinhos - RJ, Brasil

\*A quem a correspondência deve ser enviada

nos plasmídios e/ou cromossomos, portanto transmitidos para as gerações seguintes.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, mudanças na população microbiana podem levar à evolução de novos microrganismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de virulência em patógenos antigos, como o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a).

Para estimar a extensão do problema da resistência antimicrobiana e acompanhar essa evolução, programas de vigilância têm sido estabelecidos em diversos países, entre eles, o National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS), nos Estados Unidos (TOLLEFSON et al., 2003), e o Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance, no Canadá (ANONYMOUS, 2004). A maioria desses programas dedica-se à vigilância dessa resistência em agentes determinantes de zoonoses e em indicadores bacterianos da microbiota normal dos animais (*Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.). Esse procedimento representa um importante primeiro passo no esforço de entender e controlar a resistência aos antimicrobianos (SHAW et al., 1993; CHOPRA; ROBERTS, 2001; SKÖLD, 2001).

Muitas doenças são transmitidas por alimentos, entre elas podemos ressaltar as de origem bacteriana, com destaque para as causadas por *Escherichia coli*, microrganismo pertencente ao grupo dos coliformes (HOBBS; ROBERTS, 1998), bastonete GRAM negativo, mesófilo típico (crescimento a 37 °C), fermentador da lactose com produção de ácido e gás (BRASIL, 1981). De acordo com Scanlan (1991), *E. coli* de um modo geral é um comensal inofensivo pertencente à microbiota normal do intestino de animais de sangue quente, inclusive o homem, e quando presente nos alimentos indica contaminação de origem fecal. Entretanto, diversas amostras dessa espécie podem apresentar potencial patogênico e, de acordo com as manifestações clínicas que determinam e os fatores de virulência que possuem, são classificadas em ao menos cinco categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga ou *E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC). A literatura cita ainda a cepa *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC), entretanto esta ainda não está claramente definida (NATARO; KAPER, 1998).

A maricultura é uma prática que vem ganhando importância, quer pelo seu valor econômico, quer pelo nutricional. De modo especial, a mitilicultura (cultivo de mexilhões) é uma das modalidades mais produtivas que se conhece. Além do baixo custo de produção e da facilidade de manejo, a carne de mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) é um alimento de alto valor protéico, ideal para dieta saudável. Entretanto, é característico dos mexilhões e demais bivalves filtrar, concentrar e reter em seus tecidos microrganismos patogênicos causadores de toxinfecções alimentares (MARQUES; PEREIRA, 1988). Esta característica faz com que as autoridades sanitárias preocupem-se bastante com a origem deste pescado e com o seu estado de conservação. A presença de bactérias do grupo coliforme em moluscos filtradores é uma ocorrência mundial, visto que exatamente nas zonas costeiras, baías e

enseadas, locus ideais para a reprodução e crescimento dos bivalves, ocorrem escoamento de esgotos ou a desembocadura de rios que carregam contaminantes biológicos e químicos, os quais interferem diretamente na qualidade dos moluscos (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA S.A., 1994). E este fato se torna ainda mais preocupante pelo hábito da população de consumir esse produto cru ou insuficientemente cozido, como ressalta Wood (1996).

Segundo Tommasi (1980), as duas formas mais generalizadas de poluição no litoral brasileiro são a poluição fecal e por material em suspensão. Dessa forma, é de extrema importância descobrir se os patógenos humanos que vêm contaminando o meio aquático são capazes de se multiplicar entre peixes e mariscos, e igualmente estimar sua importância epidemiológica. Pesquisas vêm demonstrando que espécies *Salmonella*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Leptospira* e outras podem se abrigar e se multiplicar nesses organismos, aumentando assim as fontes de reinfecção humana (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 1994).

O presente trabalho objetivou promover um estudo da sensibilidade de 44 (quarenta e quatro) cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões crus, capturados no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, a antimicrobianos.

## 2 Material e métodos

Para o estudo das 44 cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) capturados em áreas de extrativismo no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, quanto à sua sensibilidade a antimicrobianos, utilizou-se a técnica descrita no método Kirb-Bauer (BAUER; KIRB; SHERRIS, 1966). Vinte e quatro dos principais antimicrobianos mais frequentemente utilizados na clínica médica foram testados neste estudo. Inicialmente as cepas foram cultivadas em meio de enriquecimento, caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (BRASIL, 1981), com a finalidade de obter células bacterianas jovens em 24 horas. A partir desse crescimento, as cepas foram repicadas em Agar Triptose Soja (DIFCO), obtendo assim UFCs (unidades formadoras de colônias) isoladas; dessas culturas foram feitas suspensões com 4 a 5 UFCs em 4 mL da água destilada esterilizada e padronizada a turvação com a solução padrão número 1 da escala de Mc Farland, que corresponde a  $3,8 \times 10^8$  microrganismos por mL. Uma alíquota da suspensão foi esgotada em meio Mueller-Hinton usando swab esterilizado, seguido da colocação do polidisco 24 da *Victor Lorian*® [Amicacina (Ac); Ampicilina (A); Carbenicilina (Ca); Cefalexina (Cn); Cefalotina (C); Cefotaxina (Ct); Cefoxitina (Cx); Cefazidina (Cz); Ceftriaxona (R); Ciprofloxacina (Cp); Clindamicina (Cl); Cloranfenicol (Cl); Eritromicina (E); Gentamicina (Ge); Netilmicina (Nt); Nitrofurantoina (F); Norfloxacin (Fx); Oxacilina (O); Penicilina (P); Rifampicina (Ri); Tetraciclina (T); Tobramicina (To); Trimetoprim sulf (B); Vancomicina (V)] e incubação das placas a 35 °C durante 5 horas.

Feita a medição do tamanho da zona de inibição de crescimento bacteriano, com a utilização do halômetro, a cepa de *E. coli* foi classificada como sensível ou resistente de acordo com o padrão estabelecido para cada antimicrobiano.

### 3 Resultados e Discussão

Como pode ser verificado na Figura 1, foi observado no presente trabalho que as cepas avaliadas apresentaram sensibilidade total a apenas 41,66% dos antimicrobianos (R, Ac, C, To, Fx, Cz, Ct, Nt, Cp, Ge).

Quanto à resistência antimicrobiana, Figura 2, durante esse estudo observou-se que 50% das cepas apresentaram resistência a Penicilina (P), 2,27% a Ampicilina (A), 40,90% a Oxacilina (O) e 100% a Carbenicilina (Ca), este último, representando 4,16% dos antimicrobianos. Nenhuma das cepas isoladas neste estudo apresentou resistência aos antimicrobianos: R, Ac, To, C, Fx, Cz, Ct, Nt, Cp, Ge.

A cepa número 18 apresentou sensibilidade a 95,83% dos antimicrobianos (Cx, R, E, Cl, Ac, A, To, C, Fx, Cz, Ct, Ri, P, T, O, Nt, Cp, Ci, Ge, F, Cn, V, B) enquanto que a cepa número 30 aduziu resistência a 41,66% dos antimicrobianos (Cx, E, A, Ri, T, Ca, Ci, F, V, B).

*Escherichia coli*, assim como outras bactérias, são produtoras de β-lactamases, enzimas que rompem os anéis β-lactâmicos, inativando as penicilinas. Emery e Weymouth (1997) demonstraram a existência de *E. coli* produtoras de *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs). Estas enzimas, β-lactamases de amplo espectro, são capazes de hidrolisar drogas como ceftazidima (Cz) e Cefotaxima (Ct), fato não observado

durante nosso experimento, pois constatamos que a totalidade das cepas apresentaram sensibilidade a esses antimicrobianos.

Frequentes casos de cepas diarreio gênicas de *E. coli* resistentes aos principais antimicrobianos utilizados têm sido relatados por diversos autores (van den BOGAARD et al., 2001; SCHROEDER et al., 2002; COSTA et al., 2006), e casos de cepas multirresistentes têm sido cada vez mais reportados (KRUMPERMAN et al., 1983; BACCARO et al., 2002; GUERRA et al., 2003; VELUSAMY et al., 2007), dados estes também confirmados por este estudo.

Foi observado que 50% das cepas estudadas nesse trabalho apresentaram resistência a Penicilina, 2,27%, a Ampicilina, 40,90%, a Oxacilina e 100%, a Carbenicilina. Esses dados concordam em parte com os estudos de Velusamy et al. (2007), que em seus trabalhos com cepas de *E. coli* observaram também resistência acentuada a penicilina (98,4%) e, assim como em nosso estudo, menos de 20% de resistência aos antimicrobianos amicacina, gentamicina, cefalotina, trimetropim, ceftriaxone, cefotaxima e cloranfenicol. Ambos os trabalhos concordam ainda em relação aos resultados apresentados pelos antimicrobianos norfloxacin, tobramicina e ciprofloxacina, nos quais 100% de sensibilidade foi observada. Entretanto, em relação à carbenicilina, esses autores relataram um percentual de resistência bastante pequeno, menos de 20%, enquanto nossos resultados demonstraram resistência total a esse antimicrobiano.

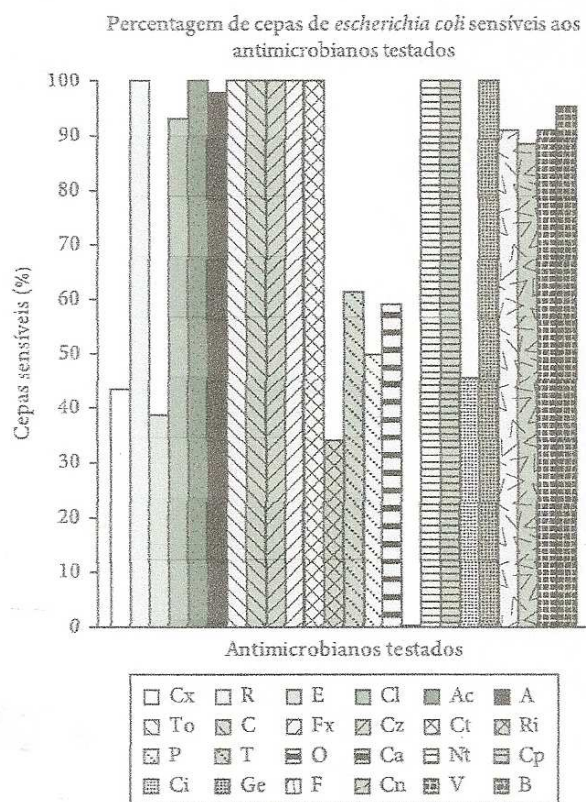


Figura 1. Percentagem de cepas de *Escherichia coli* sensíveis aos antimicrobianos testados.

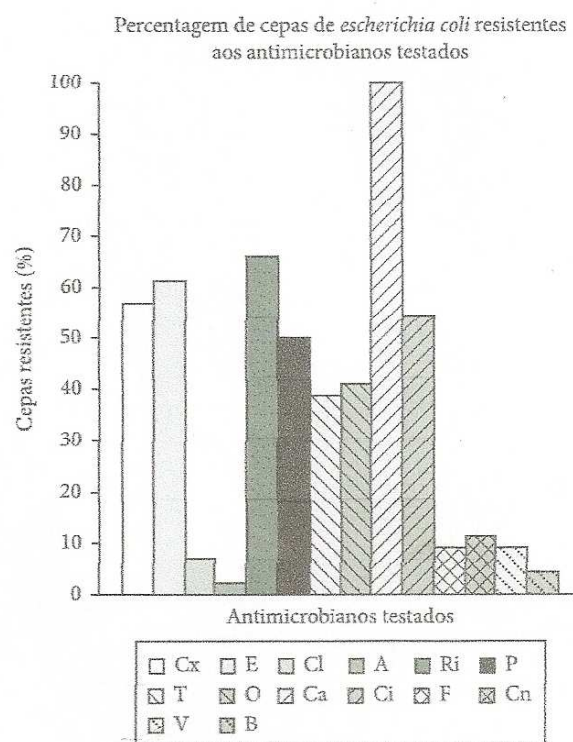


Figura 2. Percentagem de cepas de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos testados.



Para Hirsch e Zee (1999), amostras de *E. coli* usualmente são sensíveis a gentamicina, amicacina, trimetoprim, sulfazotrim (sulfametoxazol + trimeto-prim) e ceftiofur e resistentes a tetraciclina, estreptomocina, sulfonamidas, ampicilina e canamicina, dados em parte confirmados neste trabalho, uma vez que observamos sensibilidade total a, também, outros antimicrobianos, como demonstra a Figura 1. A maior resistência observada nesse estudo foi para carbenicilina (100%), seguida por rifampicina (65,9%) e eritromicina (61,36%), como observado na Figura 2.

O estudo de Baccaro et al. (2002) em amostras de *E. coli* isoladas no Estado de São Paulo revelou resistência de 87,4% das amostras a sulfazotrim, e 86,8% das amostras a ampicilina, dados bastante diversos dos observados nesta pesquisa, onde verificamos resistência de apenas 2,27% à ampicilina. Esses mesmos autores encontraram ainda resistência de 92% à norfloxacin, enquanto neste estudo foi observada 100% de sensibilidade a essa droga. Para Costa et al. (2006), as maiores resistências foram para tetraciclina, 88,6%, seguida por sulfazotrim, 73,5%, e por trimetoprim, com 66%, enquanto nesse estudo observamos resistência de 38,63% para tetraciclina e de apenas 4,54% para trimetoprim. De acordo com Blanco et al. (s.d.), as cepas de *E. coli* demonstram grande capacidade de aquisição de genes de resistência, seus estudos apontam proporção bastante significativa, de 40 a 90%, de cepas resistentes a ampicilina, estreptomocina, tetraciclina e sulfamidas, e proporção de 15 a 30% de cepas resistentes a cefalosporinas de 1.ª geração, neomicina, canamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína e quinolonas. Em relação às menores taxas de resistência, esses autores constataram-nas em relação a amoxicilina-ácido clavulânico, cefalosporinas de 2 e 3.ª geração, gentamicina, tobramicina, amicacina, colistina e polimixina B. A divergência observada pode ser atribuída à grande variabilidade das cepas e ao crescente aumento da resistência antimicrobiana entre as enterobactérias.

Valente (2004), em seu estudo com carne de mexilhão irradiada, relata que, apesar da irradiação, cepas de *E. coli* patogênicas e multirresistentes foram encontradas e que esse tratamento não diminuiu o risco potencial de ingerir cepas resistentes. Essas cepas haviam sido expostas à irradiação gama, pelo irradiador Co 60 modelo Gammacell Nordion - Canadá, com taxa de dose de 90 Gy/minuto. De acordo com o mesmo autor, que avaliou o comportamento de 23 cepas de *E. coli* patogênicas a alguns antimicrobianos, sendo 20 cepas não irradiadas, uma cepa irradiada a 3 kGy (kiloGray) e duas irradiadas a 5 kGy, o percentual de resistência foi bastante significativo para todos os grupos, sendo que para o primeiro a resistência variou de 40%, à Netilmicina, a 85%, à Cefalotina. A cepa de amostra irradiada a 3 kGy se mostrou 100% resistente a 11 dos 12 antimicrobianos testados e o terceiro grupo, irradiado a 5 kGy, apresentou 100% de resistência aos mesmos 12 antimicrobianos. Harewood, Rippey e Montesalvo (1994) estudaram os efeitos da radiação gama na vida útil e na carga microbiana e viral de mexilhões: com doses menores que 5 KGy, a taxa de mortalidade e inativação de células bacterianas vegetativas foi rápida, mas a população viral reduziu-se minimamente. Valente (2004), após submeter suas amostras a radiação de 7 KGy, não observou nenhum cultivo suspeito de *E. coli*.

Segundo o Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), a irradiação de alimentos é um processo físico de tratamento que tem por finalidade esterilizar ou preservar os alimentos através da destruição de microrganismos, parasitas, insetos e outras pragas. A CDTN relata, ainda, que pesquisas sobre irradiação de alimentos desenvolvidas juntamente com a FAO e a OMS concluíram que o processo é seguro e benéfico (CDTN, 1999). Adicionalmente, Loaharanu (1998) afirma que a irradiação apresenta-se como boa alternativa para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos e para combater as doenças de origem alimentar. De acordo com Germano, M.I.S.; Germano, P.M.L. (2001), o uso da irradiação em pescado e mariscos vem sendo bastante estudado, visto que é grande o número de pessoas que tem como hábito a ingestão desses alimentos crus ou pouco cozidos. Esses autores relatam ainda que os peixes e frutos do mar irradiados com doses que podem variar de 1,0 a 7,0 KGy tem seu tempo de conservação duplicado ou até mesmo triplicado.

Apesar de a irradiação já ser bastante estudada neste tipo de alimento, a dose ideal para a destruição total de microrganismos patogênicos ainda não foi determinada. De acordo com a resolução RDC/ANVISA/MS n.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), a dose mínima a ser absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento. Diversos autores vêm demonstrando a eficácia desse processo na conservação e na redução da carga microbiana em pescado (HAREWOOD; RIPPEY; MONTESALVO, 1994; SIQUEIRA, 2001; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L., 2001). Dickson (1995) também afirma que a maioria das bactérias de interesse para Saúde Pública são sensíveis à irradiação. Entretanto, autores como Ordal (1970), Speck (1970) e Maxcy (1982) alertam para o perigo que representam para a Saúde Pública os microrganismos patogênicos que conseguem manter-se viáveis após a irradiação, como ocorrido nos estudos de Valente (2004), que observou a presença de cepas patogênicas de *E. coli* resistentes a diferentes antimicrobianos mesmo após exposição a irradiação de 3 ou 5 KGy.

Diversos estudos vêm apontando um aumento considerável no índice de resistência múltipla aos antimicrobianos, entretanto ações simples de higiene e manejo sanitário adequados são cada vez mais relatadas como formas simples e eficazes para prevenção de doenças e possível contribuição para a redução da resistência bacteriana.

#### 4 Conclusões

Constatou-se múltipla resistência de cepas de *E. coli* a diferentes antimicrobianos, fato este que nos leva a concluir que o consumo de alimentos em geral e o de mexilhões, em particular, principalmente se crus ou pouco cozidos, contaminados por essa bactéria representa um risco à Saúde Pública e um agravamento preocupante em relação ao estabelecimento de infecções alimentares ou colonização no trato intestinal do homem.

Segundo a Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos (ICMSF) da União Internacional das Sociedades de Microbiologia (IAMS) (1997), a comunidade depende dos órgãos oficiais de Vigilância Sanitária e Saúde Pública para proteger-se das doenças veiculadas pelos alimentos, e tal proteção depende da rápida detecção dos surtos e do completo conhecimento dos agentes e dos fatores responsáveis pela transmissão da doença.

Consideramos muito importante o monitoramento da questão da resistência antimicrobiana e de sua evolução, com estabelecimento de programas de vigilância dessa resistência em agentes determinantes de zoonoses e em indicadores bacterianos da microbiota normal dos animais.

Resaltamos ainda, a importância do acompanhamento da conservação e origem desse pescado, com a devida monitorização das águas em que ocorrem o seu cultivo ou captura, que devem atender ao padrão microbiológico estabelecido pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (BRASIL, 1986), uma vez que estas podem ser veículo de microrganismos patogênicos, entre os quais a *Escherichia coli*.

### Referências bibliográficas

- HEALTH CANADA. **Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance (CIPARS) 2002**. Ottawa, 2004.
- BACCARO, M. R. et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.
- BAUER, A.W. et al. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referencia Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos microbiológicos**. Brasília, 1981.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 20, 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas doces salobras e salinas do Território Nacional. **Diário Oficial**, Brasília, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 21, 26 de janeiro de 2001. Regulamento técnico para irradiação de alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 2001.
- BLANCO, J. et al. *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales: laboratorio de referencia de *E. coli* (LREC). Disponível em: <www.lugo.USC.ES/ecoli/E.coli.html> (s.d.).
- CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR - CDTN. O que é a irradiação. **Revista Brasil Nuclear**, ano 6, n. 19, p. 14, 1999.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.
- CHUC, N. T. et al. Improving private pharmacy practice: a multi-intervention experiment in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 55, n. 11, p. 1148-1155, 2002.
- COMISSÃO INTERNACIONAL PARA ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DOS ALIMENTOS - ICMSF. **Análise dos perigos e pontos críticos de controle para garantir a qualidade e a segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.
- COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.
- DIFCO LABORATORIES. **Manual de bacteriologia**. São Paulo: Circulo do Livro, 1985.
- EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. Detection and clinical signification of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Tertiary Care medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2061-2067, 1997.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA - EPAGRI. **Manual do cultivo do mexilhão Perna perna**. Florianópolis, 1994. 140 p.
- EXLEY, H. **Alexander Fleming**. Watford: Exley Publications, 1990.
- FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados**. Roma, 1994. (Informe de un Comité mixto FAO/OIEA/OMS de expertos).
- GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Irradiação de Alimentos. In: SPOLAORE, A. J. G. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 421-442.
- GUERRA, B. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 489-492, 2003.
- HAREWOOD, P.; RIPPEY, S.; MONTESALVO, M. Effect of gamma irradiation on shelf life and bacterial and viral loads in Hard - Shelled Clams (*Mercentaria mercenaria*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2666-2670, 1994.
- HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.
- LOAHARANU, P. International developments of food irradiation. In: Memórias - SEMINÁRIO NACIONAL DE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS, 1997, México. **Anais...** México: [s.n.], 1998. p. 1-8.
- MARQUES, H. L. A.; PEREIRA, R. T. L. **Mexilhões biologia e criação**. São Paulo: Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária, 1988. p. 32. Boletim Técnico, 12.
- MAXCY, R. B. Irradiation of food for public health protection. **Journal of food protection**, v. 45, n. 4, p. 363-366, 1982.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- ORDAL, Z. J. Current development in detection of microorganisms in food. Influence of environmental factors in determination methods. **Journal of milk and food technology**, v. 33, p. 1, 1970.
- SCANLAN, C. M. **Introducción a la bacteriología veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1991. 555 p.
- SCHROEDER, C. M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 576-581, 2002.
- SHAW, K. J. et al. Molecular genetic of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 57, n. 1, p. 138-163, 1993.
- SIQUEIRA, A. A. Z. C. **Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da Tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2001. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP.
- SKOLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary Research**, v. 32, p. 261-273, 2001.
- SPECK, M. L. Selective culture of spoilage and indicator organisms. **Journal of milk and food technology**, v. 33, p. 163, 1970.

- TOLLEFSON, L.; FLYNN, W. T.; HEADRICK, M. L. Regulatory activities of the U.S. Food and Drug Administration designed to control antimicrobial resistance in foodborne pathogens. In: TORRENCE, M. E.; ISAACSON, R. E. (Eds.). *Microbial food safety in animal agriculture*. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 57-63
- TOMMASI, L. R. Poluição marinha no Brasil, uma síntese. *Ciência e Cultura*, v. 34, n. 3, p. 325-332, 1980.
- VALENTE, A. M. Efeito da irradiação sobre mexilhões [Perna perna (Linnaeus 1758)]: Coliformes termotolerantes e Enterococcus; ação antimicrobiana e análise Sensorial das amostras. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói -RJ.
- van den BOGAARD, A. E. et al. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, n. 6, p. 763-771, 2001.
- VELUSAMY, S. et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 124, n. 3-4, p. 319-328, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Food safety and Foodborne Illness*. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>>. Acesso em: 29 set. 2003.
- WOOD, P. C. *Manual de higiene de los mariscos*. Zaragoza: Acribia, 1996.

## Apêndice 2:

### Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Mariana Tavares Dias** (marianatdias@click21.com.br)

Submissão concluída com êxito! Imprima esta página para referência.

Foi enviado para seu e-mail uma mensagem com o número e título do Artigo.  
Na tabela de Submissões Completas na página inicial você pode acompanhar e ter acesso as revisões deste Artigo.

**Código do Artigo: 5208**

**Responsável:** Dra. Mariana Dias

**Categoria:** Contribuição original (Artigo)

**Área:** Microbiologia de alimentos

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CAPAS ENTEROPATOGENICAS DE E.COLI (EPEC), ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL.

<sup>1</sup>\*Dra. Mariana Tavares Dias;

<sup>2</sup>Prof. Dr. Victor Marin;

<sup>1</sup>FIOCRUZ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS), Rio de Janeiro - RJ, Brasil

<sup>2</sup>INCQS/ FIOCRUZ (Microbiologia), 21040900 rio de janeiro - rj, brasil

#### RESUMO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA), causadas por micro-organismos, representam um importante problema de saúde pública. O queijo Minas Frescal é um produto nacional, de tecnologia simples e elevada aceitação no país, tornando sua produção uma importante atividade econômica. Muitos micro-organismos podem estar presentes neste alimento, e dentre eles destaca-se a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*). De modo geral, *E. coli* é um comensal inofensivo, entretanto, algumas cepas podem apresentar potencial patogênico. Diversos surtos de DTA, associados ao consumo de queijos contaminados têm sido relatados, e a presença de cepas patogênicas de *E.coli* cada vez mais observada. Este estudo teve como objetivo isolar, avaliar a susceptibilidade antimicrobiana e caracterizar genotipicamente, através da multiplex PCR, as cepas patogênicas de *E. coli*, isoladas de queijo Minas Frescal comercializados no município do Rio de Janeiro. Trinta amostras foram analisadas e cinco cepas de *E.coli* enteropatogênica (EPEC) identificadas. A avaliação da susceptibilidade antimicrobiana revelou 40% de resistência a ampicilina e 40% de perfil de resistência intermediária a associação ampicilina-sulbactam. Tais resultados representam um alerta para as autoridades sanitárias, uma vez que este alimento é um produto de pronto consumo e, portanto, precisa ser inócuo para que a saúde da população não seja colocada em risco.

ISOLATION, GENOTYPIC CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF  
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ENTEROPATHOGENIC E. COLI (EPEC)  
ISOLATED FROM MINAS SOFT CHEESE.

ABSTRACT

Foodborne Diseases (FBD), caused by microorganisms, represents a problem of public health. The Minas cheese is a national product, simple technology and high acceptance in the country, making its production an important economic activity. Many microorganisms may be present in food, and among them there is the bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*). Overall, *E. coli* is a harmless commensal, however, some strains may have pathogenic potential. Several outbreaks of DTA, associated with consumption of contaminated cheese have been reported, and the presence of pathogenic strains of *E. coli* increasingly observed. This study aimed to isolate, evaluate the antimicrobial susceptibility and genotypically characterized by multiplex PCR, the pathogenic strains of *E. coli* strains isolated from cheese commercialized in Rio de Janeiro. Thirty samples were analyzed and five strains of *E. coli* (EPEC) identified. The assessment of antimicrobial susceptibility revealed 40% resistance to ampicillin and 40% profile of intermediate resistance to ampicillin-sulbactam combination. These findings represent a warning to health authorities, since this is a food product ready for consumption, and therefore must be harmless to people's health is not put at risk.

**Palavras-chave:** antimicrobianos; DTA; EPEC; Queijo Minas frescal

[www.cubomultimedia.com.br/sa](http://www.cubomultimedia.com.br/sa)

Uma solução cubomultimedia® sistemas acadêmicos

**Apêndice 3:**



**V SIMBRAVISA**

Hangar - Centro de Convenções e Feiras da Amazônia - Belém/PA  
13 a 17 de novembro de 2010

**COMPROVANTE DE TRABALHO APROVADO**

Trabalho nº 796

Prezado(a) MARIANA TAVARES DIAS

Seu trabalho intitulado **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE CEPAS PATOGÊNICAS DE E.COLI ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO** foi aprovado para a apresentação no **V Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária** na modalidade **Pôster e Discussão Temática**.

Comissão Científica

Belém/PA, 01/10/2010