

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA
EXTRAIESTINAL E ANÁLISE DE SEUS FATORES DE
VIRULÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA
EM CARNE MOÍDA DE AÇOUGUES DO MUNICÍPIO DE
TAQUARITINGA, SP, BRASIL.**

Edilene Santo

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como Parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária

Jaboticabal – SP – Brasil
Novembro de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDILENE SANTO, nascida em 05 de abril de 1970, na cidade de Ribeirão Preto – SP, graduada em biomedicina – modalidade médica pela Faculdade Barão de Mauá de Ribeirão Preto. Em 1994 realizou o curso de Especialização em Microbiologia ligada a infecção hospitalar no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, durante dois anos. Desde 1997 exerce a sua profissão junto a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto no laboratório de Imunohematologia Eritrocitária. Em fevereiro de 2003 obteve o título de mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP (Jaboticabal).

*“Não que sejamos capazes, por nós,
de pensar alguma coisa, como de nós mesmos;
mas a nossa capacidade vem de Deus...”*

2 CO 3:5

DEDICO

*Para minha Família,
precioso tesouro que Deus me deu.*

OFEREÇO,

Ao meu orientador, José Moacir Marin, querido mestre, companheiro e principalmente AMIGO dessa longa caminhada...

Obrigada por ter acreditado em mim.

A você todo o meu afeto e admiração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS, o meu refúgio, minha fortaleza, o meu TUDO.

Ao meu irmão Edmur, sempre presente ao meu lado, mesmos nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Sérgio, pela paciência com a minha falta e pelas palavras de conforto.

Aos Amigos:

Daniela, pelas amostras fornecidas, sem as quais não seria possível a realização desse trabalho.

Tânia Marques, pelas palavras de fé e ânimo.

Marcos Moraes Jr. e Cláudia, sempre prontos a ajudar.

Santa e Jorge, pela prestatividade em ajudar sempre.

Paulo Nogueira (Paulinho), meu amigo para sempre, como tudo que é bom.

Edna(secretária da Micro), sempre dando um jeitinho para tudo.

Márcia Ferro, pela cooperação sempre que precisei, meu muito obrigada.

*“Para realizar os sonhos, é preciso começar do começo,
e ir até o final.*

Mesmo se tivermos que reiniciar várias vezes”

Patty Pachas

AGRADECIMENTOS

A UNESP de Jaboticabal, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e de conhecer professores que com certeza, tiveram grande influência em minha formação profissional.

Ao Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela boa vontade sempre.

A todos do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pela paciência e desempenho em esclarecer as minhas dúvidas.

A Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo apoio, quando precisei.

A todas as pessoas, que contribuirão, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 A carne.....	4
2.2.1 Avaliação microbiológica da carne.....	5
2.2.2 Fatores de contaminação da carne.....	6
2.2.2.1 Manipulador.....	6
2.2.2.2 Equipamentos e utensílios.....	7
2.2.2.3 Temperatura.....	8
2.2.3 O abate.....	8
2.2.4 O resfriamento.....	9
2.2.5 O transporte.....	10
2.3 A importância da <i>E. coli</i> em saúde pública.....	11
2.4 A <i>E. coli</i> e sua classificação.....	12
2.5 A <i>E. coli</i> patogênica extra-intestinal (ExPEC).....	14
2.5.1 Como diferenciar as ExPEC.....	15
2.5.2 O problema da colonização da ExPEC no intestino humano.....	16
2.5.3 A prevenção da infecção causada por ExPEC.....	17
2.6 Características inerentes ao patógeno.....	19
2.6.1 Hemolisina.....	19
2.6.2 Colicina.....	22
2.6.3 Aerobactina.....	23
2.6.4 Pesquisa de adesinas.....	26
2.6.5 Genes de virulência.....	29
2.7 Terapêutica antimicrobiana.....	33
2.7.1 Grupos de antimicrobianos.....	35
2.7.2 Resistência as classes de antimicrobianos.....	39
2.7.3 Origem da resistência.....	42
2.7.4 Antimicrobianos usados na nutrição animal.....	44

3. OBJETIVOS.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Origem das amostras.....	46
4.2 Coleta da amostra.....	46
4.3 Isolamento e identificação das cepas de <i>E. coli</i>	47
4.3.1 Meios de cultura para isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	49
4.4 Manutenção das amostras de <i>E. coli</i>	53
4.5 Testes utilizados para pesquisa de fatores de virulência em <i>E. coli</i>	54
4.5.1 Produção de hemolisina.....	54
4.5.2 Teste da hemaglutinação.....	55
4.5.3 Produção de colicina.....	58
4.5.4 Produção de aerobactina.....	60
4.5.5 Determinação de resistência aos antimicrobianos.....	63
4.5.6 Preparação do DNA bacteriano para amplificação.....	64
4.5.7 Amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica da PCR.....	65
5. RESULTADOS.....	67
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
9. SUMMARY.....	107

Lista de abreviaturas

afa	Adesina afimbrial
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus Celsius
Caldo EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
CNF	Fator Necrozante Citotóxico
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EMB	Agar eosina azul de metileno
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extra- intestinal
FV	Fator de virulência
g	grama
ITU	Infecção do Trato Urinário
LB	Luria Bertani
ml	mililitro
MR	Manose Resistente

MS	Manose Sensível
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PAIs	Ilhas de Patogenicidade
<i>pap</i>	pili associada a pielonefrite
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P/V	Peso/Volume
QREC	<i>Escherichia coli</i> Quinolona Resistente
QSEC	<i>Escherichia coli</i> Quinolona Sensível
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
<i>sfa</i>	adesina S fímbria
THFA	Ácido Tetraidrofólico
TSB	Caldo Trypticase de Soja

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Seqüência de bases e tamanho esperado do produto amplificado pelos <i>primers</i> de oligonucleotídeos utilizados na PCR.....	66
TABELA 2: Distribuição dos fatores de virulência de cinco cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	67
TABELA 3: Análise da expressão dos fatores de virulência de cinco cepas de ExPEC obtidas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	68
TABELA 4: Tipos de hemaglutinação das cinco cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	69
TABELA 5: Correlação da presença de genes de virulência e a presença de fímbria em cinco cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	70
TABELA 6: Perfil de resistência e sensibilidade de isolados de ExPEC obtidos de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	71
TABELA 7: Distribuição dos genes de virulência das adesinas <i>pap</i> , <i>sfa</i> e <i>afa</i> em 5 cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Foto da <i>E.coli</i>	2
FIGURA 2: Distribuição do perfil de resistência de 5 cepas de ExPEC obtidas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.....	73
FIGURAS 3,4 e 5: Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	74,75,76

SUMÁRIO

Esta pesquisa foi realizada em 23 açougues da cidade de Taquaritinga, estado de São Paulo, durante um período de 10 meses. Foram isoladas duzentas e oitenta e sete cepas de *Escherichia coli* de carne moída, moedor de carne e mãos de manipuladores de carne. Cinco destas cepas foram caracterizadas como *E.coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC).

Investigou-se a presença de fímbrias, produção de hemolisina, aerobactina e colicina. Também foi analisada a presença dos genes (*pap*, *afa*, *sfa*) relacionados com a expressão de fímbrias, através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Das amostras analisadas 100% apresentavam aerobactina e fímbria do tipo 1, 80% produziam hemolisina, e 60% expressaram colicina e fímbria P. Também foi verificado que 60% das cepas de ExPEC apresentavam o genótipo *pap* e 40% o genótipo *pap-sfa* concomitantemente. Quanto ao nível de resistência aos 12 antimicrobianos testados, observou-se que 80% das cepas eram resistentes a múltiplos antimicrobianos (≥ 3). Os antimicrobianos mais eficientes foram: ceftriaxona e amoxicilina-ácido clavulânico (0%) de resistência, seguidos de amicacina, amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina com resultado, considerado satisfatório, de 20% de resistência. Em contraste, houve elevada resistência (80%) para tetraciclina e estreptomicina .

Conclui-se que retalhos de carne podem ser um importante veículo para disseminação na comunidade de cepas ExPEC. Este trabalho chama a atenção para os retalhos de carne como fonte potencial de cepas de ExPEC, que não são reconhecidas como patógeno de origem alimentar, o que pode representar um motivo de preocupação para as autoridades da vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: carne moída, açougues, fatores de virulência

1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) é uma cepa especializada de *E.coli* que tem como característica principal a presença de múltiplos fatores de virulência (FVs) como: hemolisina, aerobactina e fímbrias. É a presença desses fatores que irá permitir que a bactéria colonize a superfície de mucosas no hospedeiro e subverta os mecanismos de defesa, adquirindo nutrientes essenciais, como por exemplo, o ferro, o que facilita o estabelecimento da infecção.

As ExPEC são responsáveis pela maioria das infecções extra-intestinais como a infecção do trato urinário (ITU), bacteremias e meningite neonatal bacteriana, constituem 20% das *E.coli* intestinais e atualmente são definidas como uma linhagem comensal que irá causar doença apenas quando sair do intestino e se dirigir para um sítio estéril no hospedeiro.

Vários estudos têm sugerido que os alimentos podem ser uma fonte para disseminação de ExPEC e/ou *E.coli* resistente a antimicrobianos. O alimento serve como um veículo, permitindo as bactérias patogênicas entrar em contato com o hospedeiro, promovendo a colonização e levando ao estabelecimento da doença.

O objetivo do presente estudo foi demonstrar que a carne pode ser um veículo importante para a disseminação de ExPEC alertando para a ameaça que este patógeno pode representar para a população.



FIGURA 1: *Escherichia coli* ao ME ampliada 10.000 X – Fonte: Wikipedia atlas virtual ilustrado.

2. Revisão da Literatura

2.1 Histórico

O gênero *Escherichia coli* foi assim denominado em homenagem ao seu descobridor Theodor Von Escheich que descreveu *Escherichia coli* em 1885. Originalmente essa bactéria era denominada *Bacillus coli commune* e com o passar do tempo foi recebendo vários outros nomes como: *Bacillus coli* por MIGULA em 1895, *Bacterium coli* por LEHMANN em 1896 até chegar no nome atual: *Escherichia coli* (PELCZAR et al, 1997).

E.coli foi muito estudada ao longo da história por vários pesquisadores. Em 1908 GUYOT observou que algumas cepas de *E.coli* eram capazes de aglutinar glóbulos vermelhos e mais tarde, em 1943, ROSENTHAL evidenciou que culturas com capacidade de hemaglutinação também poderiam aglutinar esperma, leveduras e até mesmo pólen. A propriedade de hemaglutinação foi associada com a expressão de estruturas de superfície na bactéria, as quais são finas e filamentosas denominadas de fímbrias ou pili (DUGÜID et al, 1955).

E.coli pode ser sorologicamente separada em aproximadamente 160 grupos antigênicos somáticos O e ainda divididos em sorotipos baseados em antígenos K (capsular) e H (flagelar). Foi observado que cada um desses antígenos possuía propriedades particulares, como por exemplo: o antígeno somático O era termoestável a 100°C por 2 horas; o antígeno K era destruído pelo aquecimento a 100°C em 1 a 2 horas e o antígeno flagelar era termolábil a 65°C por 5 minutos (KAUFFMAN, 1944).

2.2) A carne

A carne é uma excelente fonte de proteínas de alta qualidade, de vitaminas do complexo B e de certos minerais (especialmente o ferro), sendo facilmente digerida, e quando cozida, a carne magra fornece nutrientes que contribuem significativamente para um equilíbrio dietético das refeições, daí sua importância (PARDI, 1995).

É um alimento nutricionalmente denso, importante para a manutenção da saúde, amplamente utilizado em refeições institucionais, que requer inspeção sanitária rigorosa, conservação adequada e controle total de qualidade (FERREIRA & SOBRINHO, 2003).

A carne, por suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade, é um ótimo meio para o desenvolvimento de microrganismos. O músculo do animal vivo é estéril, porém, a partir do abate e do processamento, inicia-se a sua contaminação por microrganismos procedentes do couro, do trato intestinal, dos manipuladores, do meio ambiente, dos equipamentos e utensílios. Logo a contaminação da carne por microrganismos poderá colocar em risco a saúde do consumidor, afetar a qualidade da carne e o seu tempo de conservação (CHESCA et al, 2001).

2.2.1) Avaliação microbiológica da carne

A avaliação microbiológica dos alimentos é assunto de interesse desde o início da microbiologia como ciência. Esta avaliação constitui-se em um dos parâmetros mais importantes para se determinar a qualidade e a sanidade dos alimentos, e é igualmente importante para verificar se padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidas adequadamente. Como geralmente as condições higiênico-sanitárias no abate de animais, comercialização e consumo da carne em nosso meio são precárias, verifica-se a presença de microrganismos patogênicos, entre eles podemos destacar a *E.coli* em carne moída, o que constitui um sério risco para a saúde do consumidor, uma vez que esse microrganismo pode levar a doença (CONCEIÇÃO et al, 2003).

A necessidade de apresentar ao mercado um produto de qualidade cresce a cada dia. A qualidade vem sendo considerada o fato de maior importância na área alimentar, visto que dela depende a competitividade das empresas e mesmo, sua sobrevivência no mercado consumidor (BLOCK, 1999).

A qualidade dos produtos nunca ocorre por acaso. É sempre o resultado de esforços aplicados ao controle das diferentes etapas do processamento. Os fatores tecnológicos e humanos afetam a qualidade de um produto; entretanto, o indivíduo é o fator mais importante a ser considerado (BLOCK, 1999).

O manipulador de alimentos com deficiente higiene pessoal, práticas inadequadas de higiene durante a manipulação de alimentos, dos utensílios, dos equipamentos e do ambiente, bem como a existência de instalações inadequadas e armazenamento incorreto de alimentos, são as principais causas de toxinfecções alimentares (LIMA et al, 1998).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1999), as toxinfecções alimentares, enfermidades produzidas pela ingestão de alimentos contaminados ou substâncias tóxicas, constituem um importante problema sanitário difundido mundialmente, portanto é impossível imaginar a produção e distribuição dos alimentos sem uma avaliação prévia de sua qualidade microbiológica e das condições higiênico-

sanitárias dos locais onde estão sendo produzidos, conservados e distribuídos, como também das pessoas que entram em contato direto com esses alimentos (SILVA, 1999).

O consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos pode levar o indivíduo a um quadro infeccioso que varia de um desconforto leve, até reações severas. As enfermidades transmitidas pelos alimentos têm também um impacto sócio-econômico considerável, podendo resultar na incapacidade para o trabalho ou para cuidar da casa ou da família. Durante a recuperação, as atividades do afetado podem ser limitadas, alterando consideravelmente a capacidade produtiva do indivíduo. Portadores assintomáticos podem inadvertidamente contaminar outros alimentos ou infectar outras pessoas, as quais continuarão a participar de uma contaminação contínua de toda a cadeia alimentar (SILVA, 1999).

2.2.2) Fatores de contaminação da carne

2.2.2.1) Manipulador

No estudo das origens e medidas de controle da contaminação dos alimentos deve sempre se destacar a participação do manipulador, o qual representa, sem dúvidas, o fator de maior importância no sistema de proteção dos alimentos às alterações de origem microbiana (PANETTA, 1998).

O manipulador deve manter os hábitos de higiene pessoal como: banhos diários, mãos lavadas antes da manipulação dos alimentos, unhas mantidas curtas e limpas (PANETTA, 1998). Para evitar contaminações e acidentes durante a manipulação dos alimentos algumas regras devem ser observadas:

- O manipulador de alimentos deve se apresentar devidamente uniformizado, trajando uniforme completo, de preferência de cor clara, limpo, em bom estado de conservação e adequado ao ambiente de trabalho.
- Os sapatos devem ser fechados, impermeáveis e utilizados com meias, ambos em boas condições de higiene e conservação.

- Todos os adornos como jóias, bijuterias, relógios e acessórios que possam cair ou se desprender, provocando acidentes durante o processamento dos alimentos devem ser retirados e guardados em local apropriado.
- Os homens devem estar devidamente barbeados. O uso de barbas, bigodes e costeletas devem ser evitados.
- O manipulador de alimentos não deve tossir, espirrar ou conversar sobre os alimentos, em caso de necessidade, antes de tossir ou espirrar afastar-se do produto, cobrir a boca e nariz com lenço de papel e em seguida lavar as mãos para evitar a contaminação (SENAC, 2006).

A contaminação dos alimentos através dos manipuladores, os quais podem estar eliminando microrganismos patogênicos sem apresentarem sintomas de doença comprometendo assim os alimentos por hábitos inadequados de higiene ou por práticas inadequadas devido à desinformação, torna patente a necessidade de constantes treinamentos dos funcionários que manipulam os alimentos durante todas as etapas do processamento, pois somente através de eficazes e permanentes programas de treinamento, informação e conscientização dos manipuladores é que será possível produzir e oferecer ao consumidor alimentos seguros com propriedades nutricionais que satisfaçam a um consumidor cada vez mais exigente e informado (PANETTA, 1998).

2.2.2.2) Equipamentos e utensílios

A sanificação assegura a máxima destruição dos microrganismos, reduzindo a carga microbiana a valores muito baixos e compatíveis com a obtenção de produtos em boas condições higiênico-sanitárias. Esta etapa deve ser realizada antes do início das atividades de manipulação de alimentos, garantindo um curto período de contato do sanificante com a superfície a ser limpa, mantendo assim ausência da multiplicação de microrganismos no período entre o final da sanificação e o início das atividades. No caso de açougues, por exemplo, facas, peças e acessórios de equipamentos podem ser sanificados por imersão em água quente na temperatura de 80°C, por 5 minutos

(SENAC, 2006). Essa etapa de sanificação de utensílios é muito importante, já que é um dos fatores que irá afetar na qualidade do produto (MENDES et al, 2001).

SILVA & MARTINS (1991), analisando 281 equipamentos e 633 utensílios de preparação em 83 cozinhas industriais detectaram que as facas de cozinha foram os utensílios que registraram o maior índice de contaminação (95%).

Apesar da importância da análise de equipamentos e utensílios utilizados para manipulação de diversos alimentos, no Brasil ainda não se definiu parâmetros com relação a análise quantitativa destes (MARTINS et al, 2001).

2.2.2.3) Temperatura

Os microrganismos podem se multiplicar em uma faixa muito ampla de temperatura, havendo registro de multiplicação em um mínimo de -35°C e a um máximo de 90°C (SENAC, 2006).

As bactérias patogênicas geralmente cessam por completo sua multiplicação em temperaturas abaixo de 5°C , com exceções para *Yersinia enterocolitica* que é capaz de se desenvolver abaixo de 0°C e *Clostridium botulinum* tipo E, que se multiplica a temperatura de até 3°C (CONCEIÇÃO et al, 2003).

2.2.3) O abate

Quando se dá o abate do animal ocorre a interrupção da circulação sanguínea dos tecidos, iniciando-se uma série de processos enzimáticos, formação de ácido láctico, queda de pH e diminuição da quantidade de ATP. Em decorrência desse processo, parte da água é pressionada para fora dos tecidos, desidratando a carne e provocando o seu endurecimento. Durante o processo convencional de armazenamento, as enzimas proteolíticas da carne denominadas catepsinas decompõem as proteínas promovendo o amaciamento "*post-mortem*" responsáveis pela textura da carne. Caso essa decomposição parcial das proteínas denominada maturação da carne, tenha continuidade ocorrerá a produção de significativas quantidades de amônia tornando a carne imprópria para o consumo, desse modo, a maturação da carne, bem como a

deterioração são considerados processos contaminantes nos quais deve-se tomar cuidados especiais para não afetar o produto final, a carne (MENDES et al, 2001).

2.2.4) O resfriamento

O processo de resfriamento das carnes inicia-se logo após o abate quando as carcaças são submetidas a 15°C, em câmara especial, para que se instale corretamente o "*rigor mortis*", uma vez que, a carne resfriada a temperatura muito abaixo do desejável sofrerá encurtamento da fibra muscular promovendo o seu enrijecimento. Uma das formas de se evitar este encurtamento e garantir a maior segurança microbiológica é o resfriamento de maneira rápida a temperaturas inferiores a 10°C entre 8 a 15 horas após o abate (PARDI, 1995).

O processo de refrigeração é o processo mais importante no controle da multiplicação de microrganismos patogênicos, por isso deve-se dispensar um cuidado especial nessa etapa. Um dos pontos frágeis da refrigeração da carne é quando se leva o produto aos locais de entrega, nessa etapa do processo a carne é transferida para o retalhista ficando sujeita a inúmeras oscilações de temperatura diminuindo a qualidade da carne distribuída, além disso, a temperatura de exposição nos locais varejistas frequentemente é elevada, acima de 10°C (JAMES, 1996).

Segundo BRASIL (1996) do Ministério da Agricultura o caminhão que realiza o transporte de carne bovina até o mercado varejista deve ser refrigerado, com temperatura interna na faixa de 2°C a 4°C, para que o produto em nenhum momento durante o transporte atinja temperatura superior a 7°C.

O resfriamento da meia carcaça e o transporte da mesma são considerados pontos críticos de controle eficiente e não absoluto, pois o resfriamento adequado inibe a multiplicação de microrganismos, mas não garante que a carne esteja com qualidade para o consumo (SILVA, 1999).

2.2.5) O transporte

A transferência da etapa de desosso dos frigoríficos para as casas retalhistas (açougues, entrepostos, supermercados) dá margem para o surgimento de uma etapa extremamente comprometedora para a qualidade microbiológica da carne bovina, o transporte da mesma. Esta etapa é considerada um ponto crítico de controle a ser monitorado, devido as constantes oscilações de temperatura e umidade, assim como pelo surgimento da figura do “lombador”, indivíduo que transporta a meia carcaça, do caminhão até o interior do estabelecimento retalhista, na suas costas, podendo promover a contaminação da carne que por muitas vezes fica em contato direto com a roupa desse “lombador”(SILVA, 1999).

O transporte de carne com osso, sob forma de quartos e a desossa dessas peças em açougues e supermercados parecem constituir inconvenientes de ordem higiênico-sanitária e desperdício econômico. O manuseio inadequado e anti-higiênico dos quartos e de peças “nuas” até o mercado varejista desvirtua todos os cuidados dispensados ao produto ainda no matadouro ou nos entrepostos (MENDES et al, 2001).

Nesse sentido, BRASIL, 1996 - Portaria nº 304/96 do Ministério da Agricultura instituiu um programa de distribuição de carnes bovinas ao comércio varejista, envolvendo a padronização de cortes, embalagem, rotulagem e distribuição dos produtos com o propósito de reduzir e dificultar a ação do comércio clandestino, porém infelizmente grande parte dos mercados e açougues espalhados pelo Brasil não obedecem as regulamentações da referida portaria, colocando em risco a qualidade da carne distribuída ao consumidor (MENDES et al, 2001; CONCEIÇÃO et al, 2003).

Para realizar um transporte adequado da carne devem-se seguir alguns requisitos pré-determinados pela Portaria CVS – 6/99

- O meio de transporte de carne, destinado ao consumo humano, deve ser refrigerado, para garantir a integridade e a qualidade a fim de impedir a contaminação e deterioração.
- Não é permitido transportar conjuntamente com a carne pessoas ou animais.

- A cabine do condutor deve ser isolada da parte que contém a carne e esta deve ser revestida de material liso, resistente, impermeável, atóxica e lavável.
- Os veículos de transporte de carne devem possuir certificado de vistoria, de acordo com a legislação vigente.
- Os métodos de higiene e desinfecção devem ser adequados às características dos produtos.
- Os materiais utilizados para a proteção e fixação da carga não devem constituir fonte de contaminação ou dano para o produto, devendo os mesmos serem desinfetados juntamente com o veículo de transporte.
- A carga e/ou descarga não devem representar risco de contaminação, dano ou deterioração da carne.
- A carne não deve ser transportada em contato direto com o piso do veículo ou embalagens e recipientes abertos.
- Os equipamentos de refrigeração não devem apresentar risco de contaminação para a carne e deve garantir durante o transporte temperatura adequada (até 7°C).
- A carne deve ser transportada em veículo fechado.

2.3) A importância da *E.coli* em Saúde Pública

A *E.coli* faz parte da microbiota normal do trato intestinal dos homens e dos animais e sua presença na carne geralmente indica contaminação de origem fecal direta ou indireta (BLOCK,1999).

A contaminação direta é devida a higiene pessoal inadequada como, por exemplo: não lavar as mãos após ir ao banheiro e a indireta seria a contaminação de objetos que irão transferir microrganismos para novos objetos, alimentos ou diretamente para a boca do hospedeiro (MORELLO, 1984).

Apesar da *E.coli* ser uma bactéria que pode ser introduzida no alimento a partir de outras fontes, sem ser as fecais, ela é reconhecida como o melhor indicador de contaminação fecal até o presente (JOHNSON et al, 2001 b).

Por ter sido considerada como um patógeno oportunista, o interesse das indústrias de alimento sobre o microrganismo tem sido restrito nesta área, como um microrganismo indicador. Entretanto, nos últimos anos a *E. coli* tem sido reconhecida como um patógeno específico tanto de ambiente intestinal quanto extra-intestinal (VARNAM & EVANS, 1996).

2.4) A *E. coli* e sua classificação

A *E. coli* é provavelmente a bactéria mais estudada e uma das mais comumente isoladas no laboratório clínico de microbiologia. As cepas de *E.coli* biologicamente significantes para o ser humano podem ser classificadas (baseando na genética e critérios clínicos) em 3 grandes grupos: comensais, patogênicas intestinais (entéricas ou diarréicas) e patogênicas extraintestinais (RUSSO & JOHNSON, 2000).

A) *E.coli* comensal:

Constitui a microbiota fecal facultativa na maioria dos humanos saudáveis, outros mamíferos e pássaros (JAWETZ et al, 1998).Essas cepas de *E.coli* comensais se adaptam passivamente com o hospedeiro e não causam doenças, sendo que a maioria origina-se da *E.coli* do grupo filogenético A (RUSSO & JOHNSON, 2000).

B) *E.coli* patogênica intestinal:

Raramente são encontradas na microbiota fecal de hospedeiros saudáveis e é essencialmente obrigatório causar gastroenterites ou colites quando ingeridas em quantidades suficientes (PELCZAR et al, 1997). Existe neste grupo uma diversidade filogenética sendo que seus membros derivam dos grupos filogenéticos A, B1 ou D ou ainda de outras linhagens, portanto não possuem uma origem filogenética comum, mas uma combinação específica de traços de virulência, os quais podem ter sido adquiridos através da transferência horizontal (plasmídeo ou fago lisogênico) de membros distantemente relacionados na evolução das linhagens (RUSSO & JOHNSON, 2000).

A maioria dessas cepas possui habilidade de causar doenças entéricas, porém são incapazes de causar doença fora do trato intestinal, neste grupo estão: *E.coli* enteropatogênica (EPEC); *E.coli* enterotoxigênica (ETEC); *E.coli* enteroemorrágica (STEC/EHEC); *E.coli* enteroinvasiva (EIEC); *E.coli* enteroagregativa (EAEC) e *E.coli* aderente difusa (DAEC) (RUSSO & JOHNSON, 2000).

C) *E.coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC)

É um grupo que se distingue das *E.coli* comensais e patogênicas intestinais, são cepas que parecem ser incapazes de causar doenças entéricas, mas podem colonizar o trato intestinal e devem constituir aproximadamente 20% das cepas predominantes em indivíduos saudáveis (JOHNSON, 1991).

Em contraste com as cepas de *E.coli* patogênicas intestinais, a aquisição das extra-intestinais pelo hospedeiro é insuficiente para a infecção ocorrer. No passado a habilidade de semelhante cepa colonizar assintomaticamente o trato intestinal de humanos causava considerável incerteza se a cepa era um patógeno ou meramente uma cepa comensal oportunista (RUSSO & JOHNSON, 2000).

Essas cepas são em geral do grupo filogenético B2 ou D e possuem genes para várias combinações de adesinas (P e S fímbria), sistema de aquisição de ferro (aerobactina), mecanismos contra as defesas do hospedeiro (cápsula ou antígeno "O" específico) e toxinas (hemolisina), características reconhecidas como fatores de virulência extra-intestinais (RUSSO & JOHNSON, 2000).

2.5) A *E.coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC)

A *E.coli* constitui o principal componente da microbiota intestinal da maioria dos seres humanos, outros mamíferos e pássaros, porém é pouco avaliado que certas *E.coli* patogênicas podem causar infecções fora do trato intestinal e representar um perigo maior a saúde, do que a *E.coli* O157:H7 (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

A *E.coli* pode causar diversas infecções extra-intestinais como, por exemplo, bacteremia (adquirida na comunidade) ou a septicemia, sendo mais comum a infecção do trato urinário (ITU). Todas essas infecções levam o hospedeiro a um grupo heterogêneo de desordens que coletivamente causam considerável morbidade, perda de produtividade e aumento de custos para o hospedeiro e para o sistema público de saúde (JOHNSON & RUSSO, 2002 b).

A infecção causada por ExPEC não tem chamado a atenção pública como a infecção causada por *E.coli* patogênica intestinal, talvez isso ocorra porque em contraste com a *E.coli* O157:H7, a infecção por ExPEC não ocorre de forma epidêmica e sim discreta, aparentemente não é proveniente de alimento contaminado e em muitas vezes, causa somente uma pequena morbidade no hospedeiro (Ex: cistite) ou um leve comprometimento (Ex: início de pneumonia), sendo assim a infra-estrutura da saúde pública trabalha constantemente para detectar as infecções causadas por *E.coli* patogênica intestinal tornando-as notória, enquanto que as infecções causadas por ExPEC não são citadas ou dada a devida importância (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

2.5.1) Como diferenciar as ExPEC

São responsáveis pela maioria das infecções de *E.coli* extra-intestinal em indivíduos não comprometidos e diferem das comensais e intestinais através das seguintes características: as comensais são tipicamente derivadas do grupo filogenético A ou B1 e são deficientes da maioria dos fatores de virulência (FVs); as *E.coli* intestinais patogênicas raramente causam doenças extra-intestinais, derivam do grupo filogenético A, B1 ou D ou linhagens que não tem um grupo específico, possuem distintos FVs como produção de shigatoxina (Ex: *E.coli* O157: H7) que confere adesão da bactéria (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

A ExPEC deriva predominantemente do grupo filogenético B2 e um pouco menos do grupo D e de específicos clones desses grupos (JOHNSON et al, 2001 a). A ExPEC exibe uma ampla extensão de FVs extra-intestinais que permite que a cepa colonize as superfície das mucosas do hospedeiro, subvertendo os mecanismos de defesa e assim adquirindo nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento provocando no hospedeiro uma resposta inflamatória (JOHNSON, 1991).

As ExPEC são incapazes de causar doenças gastrointestinais no homem, mas podem estabelecer prolongadas colonizações assintomáticas no trato intestinal do hospedeiro, esta bactéria deve ser uma colonizadora intestinal mais efetiva do que uma cepa tipicamente comensal fecal (JOHNSON 1991; WOLD et al, 1992).

As ExPEC tem constituído 20% das *E.coli* intestinais, porém é importante dizer que o isolamento de uma cepa de *E.coli* em pacientes com infecção extra-intestinal não confere o termo ExPEC, pois uma simples cepa comensal de *E.coli* também poderia causar infecção extra-intestinal, para ser considerado ExPEC a cepa de *E.coli* tem que ter necessariamente 2 ou mais fatores de virulência e estabelecer infecção em indivíduos saudáveis (JOHNSON & RUSSO, 2002 a; RUSSO & JOHNSON, 2000).

2.5.2) O problema da colonização da ExPEC no intestino humano

O grande risco da colonização das ExPEC no intestino humano seria a transferência horizontal dos FVs, que podem converter cepas comensais em uma potencial cepa patogênica. Os fatores responsáveis por esse processo representam um mistério para a comunidade científica (JOHNSON et al, 2001 b).

Os genes para múltiplos fatores de virulência frequentemente estão juntos em grandes blocos de cromossomos chamados de ilhas de patogenicidade (PAIs) (RUSSO & JOHNSON, 2000). Presumi-se que os genes para FVs unem-se nessas PAIs pois ganham vantagem quando presentes em grupo e sendo assim são transmitidas horizontalmente para outra bactéria (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

A concentração de genes de virulência extra-intestinal em certas linhagens de *E.coli* tem resultado no conceito de clones virulentos. A existência desses clones foi sugerida pois, eram sempre encontrados em isolados de *E.coli* em pacientes com pielonefrite, bacteremia e/ou meningite neonatal quando comparado com isolados fecais de hospedeiros saudáveis (RUSSO & JOHNSON, 2000).

2.5.3) A prevenção da infecção causada por ExPEC

O primeiro passo para a prevenção seria impedir a colonização das ExPEC nos sítios anatômicos. Pode-se tomar como exemplo quando ocorre a colonização da vagina por *E.coli*, esta predispõe o hospedeiro a ter ITU. Medidas podem ser tomadas para reduzir essa colonização, como o uso de espermicidas que irão promover mudança de pH da mucosa vaginal dificultando a colonização bacteriana (STAPLETON et al,1991).

Uma dificuldade para a prevenção seria o controle dos reservatórios naturais que são em muitos casos parceiros sexuais ou membros da família os quais são portadores de ExPEC e podem reintroduzir esse patógeno em outros indivíduos e causar infecções primária ou recorrente (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

Como a principal característica da ExPEC é a presença dos FVs, a melhor prevenção contra a infecção seria neutralizar a ação dos FVs da bactéria, para que isso ocorra temos que primeiramente conhecer os mecanismos de ação de cada FVs para então ocorrer a intervenção prevenindo a doença (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

Em modelos animais a imunização ativa ou passiva contra hemolisina, cápsula e fímbria P e/ou fímbria do tipo 1 protege contra infecção por ExPEC que expressam esses FVs (JOHNSON, 1991). Pode-se utilizar receptores análogos os quais podem saturar as adesinas bacterianas privando a bactéria de ter receptores na célula do hospedeiro, além disso, podemos adotar medidas farmacológicas para diminuir a expressão dos receptores do hospedeiro. Esses são um dos caminhos para proteger o hospedeiro da infecção por ExPEC em cepas que apresentam a fímbria P e/ou fímbria do tipo 1(JOHNSON, 1991).

Outra maneira de proteção seria a vacinação. A primeira vacina anti-FVs, aplicada clinicamente em seres humanos, tem ação contra a fímbria do tipo 1 "Fim H", que é comumente encontrada nas ITU, como as cistites (JOHNSON & RUSSO, 2002 a). Futuras vacinas deverão proteger o indivíduo contra outras infecções extra-

intestinais causadas por ExPEC, que deverão incluir combinações de FVs, porém deve-se lembrar que é de extrema importância que se consiga identificar os reservatórios e formas de transmissão de ExPEC, para que intervenções apropriadas possam ser desenvolvidas para proteger indivíduos vulneráveis quando expostos a essas cepas. Associado a isso se deve adotar medidas para bloquear a colonização intestinal por ExPEC, pois desse modo mesmo que o hospedeiro venha a ingerir esse patógeno este não irá colonizar o intestino reduzindo o risco de ocorrer a transferência horizontal (entre ExPEC e cepas comensais de *E.coli*) e do patógeno se disseminar para outros sítios do corpo do hospedeiro (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

2.6 Características inerentes ao patógeno:

2.6.1 Hemolisina

KAYSER (1903 in CAVALIERI et al, 1985) observou que algumas culturas de *E. coli* lisavam eritrócitos e que o sobrenadante de cultura contendo *E. coli* retinha uma atividade hemolítica após serem filtrados através do filtro de Chimberland.

DUDGEON & PULVERTAFT (1927 in CAVALIERI et al, 1985), relataram também a atividade hemolítica de culturas de *E. coli* e acreditavam que essa hemólise era associada a células de *E. coli*. Isso só foi confirmado quando LOVELL & REES (1960 in CAVALIERI et al, 1985), obtiveram uma bactéria livre de hemólise em um filtrado de caldo infuso de carne.

SMITH (1963) foi o primeiro a demonstrar que sob as mesmas condições de crescimento algumas cepas hemolíticas de *E. coli* poderiam produzir dois diferentes tipos de proteínas simultaneamente em placas de ágar sangue, que eram: alfa-hemolisina e beta-hemolisina. A alfa-hemolisina apresenta alto peso molecular e pode ser excretada pela bactéria, possuindo ação mais acentuada sobre linfócitos, já a beta-hemolisina permanece ligada à parede celular e manifesta ação inibitória durante a fagocitose e quimiotaxia.

INUKAY & KODOMA (1965) sugeriram que componentes do caldo de carne estimulavam a liberação de alfa-hemolisina de superfície de célula bacteriana, isso só foi confirmado quando JORGENSEN et al, (1976), descobriram que a molécula termo estável presente no caldo de carne era um importante componente para a produção de alfa-hemolisina, a qual era produzida proporcionalmente.

WALTON & SMITH (1969) descobriram um terceiro tipo de hemólise produzida por um mutante resistente ao ácido nalidíxico o qual foi chamada de gama- hemólise.

As hemolisinas são proteínas que são secretadas extracelularmente por algumas cepas de *E. coli*, as quais possuem uma ação citotóxica para uma variedade de tipos de células incluindo eritrócitos, fibroblastos, granulócitos e outros leucócitos humanos (CAVALIERI et al, 1985; KONIG et al, 1986).

Aproximadamente 50% das cepas de *E.coli* que causam infecções extra-intestinais em humanos secretam a hemolisina. Essas cepas recebem o nome de hemolíticas, nas quais se observam zonas de hemólise ao redor da bactéria em placas de ágar sangue (HUGHES et al, 1983).

O mecanismo de produção e excreção da hemolisina parece ser controlado geneticamente (WAGNER et al, 1983; CAVALIERI et al, 1985). Sua produção é codificada em nível cromossômico (HULL et al, 1982; HACKER et al, 1983) em isolados de ITU em humanos e em nível plasmídial em casos de ITU em animais de laboratório (MINSHEW et al, 1978; HUGHES et al, 1983; HULL et al, 1982).

GOEBEL et al.(1974 in CAVALIERI et al, 1985) demonstraram que as cepas de *E. coli* hemolíticas possuem um ou mais plasmídios envolvidos na síntese e secreção das hemolisinas. Esses plasmídios funcionam como *cluster*, mas ainda não está bem esclarecido onde essas proteínas, as hemolisinas, são traduzidas e por quais mecanismos são liberadas (FELMLEE et al, 1985).

Estudos usando a engenharia genética têm demonstrado que em *E.coli* a capacidade hemolítica significativamente contribui para a virulência da bactéria em modelos animais (HACKER et al, 1983; CAVALIERI et al, 1985;

EBERSPÄCHER et al, 1989) e que essas características hemolíticas podem ser transferidas através da conjugação de uma cepa hemolítica para uma não hemolítica (SMITH & HALLS, 1967 in CAVALIERI et al. 1985).

Anticorpos contra *E. coli* hemolítica estão presentes no plasma de todos adultos, indicando que a proteína é produzida pela bactéria no hospedeiro (EBERSPÄCHER et al, 1989). Pacientes com infecções causadas por *E. coli* alfa hemolítica mostraram aumento do título de anticorpos alfa-hemolíticos, sendo que essa alfa hemolisina provavelmente contribui para o desenvolvimento de certas patologias como a síndrome urêmica hemolítica (EMODY et al, 1989).

As amostras de *E. coli* hemolíticas podem ser isoladas de várias fontes. Em humanos, uma baixa porcentagem, aproximadamente 12%, das amostras de *E. coli* fecal, são hemolíticas comparadas com 35 a 50% das amostras de *E. coli* hemolíticas causando infecções extra-intestinais como: bacteremia, septicemia e ITU (MINSHEW et al, 1978; HUGHES et al, 1983).

Entre as *E. coli* causadoras de ITU a produção de hemolisina é freqüentemente associada com outros fatores que contribuem para a virulência que seriam: resistência a manose causada por uma proteína específica da pili e antígenos específicos O e K (HACKER et al, 1983), acreditando-se que a virulência da *E. coli* seja multifatorial (CAVALIERI et al, 1985).

A hemolisina pode contribuir com o processo da doença de 3 modos: a) por ser citotóxica para as células do tecido "in vitro", logo deve prejudicar as células "in vivo" e contribuir diretamente para a patologia do tecido; b) afetando os mecanismos de defesa do hospedeiro (leucócitos e suas funções) permitindo a sobrevivência do microrganismo; c) lise do eritrócito, mecanismo através do qual o microrganismo irá obter ferro para permanecer vivo e talvez para continuar a síntese de hemolisina (CAVALIERI et al, 1985).

Em estudos clínicos, foi demonstrada a maior incidência de *E. coli* produtora de hemolisina em pielonifrite aguda (49%), seguido de 40% nos casos de cistite e 20% nos casos de bacteriúria assintomática. A produção de hemolisina foi mais prevalente nos casos de ITU alta (51%) do que baixa (30%) (JOHNSON, 1991).

Por meio da análise de virulência de *E. coli* uropatogênica, foi verificado não existir relação entre a infecção causada por cepas mais virulentas e gravidade dos sintomas. Estudos com experimentação animal mostraram bom índice de proteção com a utilização de vacinas anti-hemolisina, o que reforça a necessidade de estudos clínicos neste sentido (HUGHES et al, 1983).

2.6.2 Colicina

A colicina V foi descrita há 8 décadas por GRATIA (1925), como “princípio V” em filtrado de célula livre de *E. coli*. Essas células eram “aparentemente normais”, porém capazes de causar lise a outras células, similar a lise causada por bacteriófagos, mas com um comportamento diferenciado, pois passavam através de membrana impermeável e ainda conferia à bactéria estabilidade ao clorofórmio e ao soro. Por meio de vários experimentos foi verificado que a atividade da colicina V parecia ser específica para certos patógenos como amostras de *E.coli*, *Shigella* e *Salmonella*, sugerindo o seu potencial papel de virulência (GRATIA, 1925 in WATERS & CROSA, 1991; BINDEREIF & NEILANDS, 1985).

A colicina é uma proteína produzida por algumas amostras de *E. coli*, e são classificadas, aproximadamente, em 20 tipos: A, B, I, V entre outros (DAVIES et al, 1981). Sua produção foi considerada um importante fator de virulência em *E. coli* invasora, já que através de experimentos observou-se sua presença em grandes proporções (SMITH, 1974; SMITH & HUGGINS, 1976 in DAVIES et al, 1981).

Estudos indicaram que a colicina V deve ser mais comumente produzida por amostras responsáveis por uma variedade de infecções extra-intestinais,

mostrando que a sua produção deve ser usualmente indicadora da presença de determinantes de virulência, assim a colicina V é o tipo mais freqüentemente produzido por amostras de *E. coli* responsáveis por ITU em pacientes hospitalizados (BINNS et al, 1979).

Vários trabalhos têm mostrado a relação do plasmídio COL V (plasmídio que codifica a colicina V) com o aumento de patogenicidade e o poder invasivo das cepas (BRENNAND et al, 1989).

SMITH (1974 in DAVIES et al 1981) observou que 78% das *E. coli* responsáveis por infecções em gado produziram colicina V e que a eliminação do plasmídio COL V invariavelmente reduzia a virulência das amostras testadas, sendo reinstalada após a reintrodução do plasmídio por conjugação (DAVIES et al, 1981).

Muitas propriedades têm sido associadas com o plasmídio COL V como: sobrevivência ao soro, resistência à fagócitos, mudança na motilidade, aderência à célula do epitélio intestinal, sistema de captação de ferro, entre outras (WATERS & CROSA, 1991).

O papel do ferro como um modulador de virulência tem sido reconhecido, apesar de ser um nutriente indispensável para o crescimento bacteriano, não está disponível livremente nos mamíferos. Assim, a habilidade do patógeno competir com o hospedeiro por esse elemento vital é considerado ser um pré-requisito para estabelecer a infecção (WEINBERG, 1984 in BINDEREIF & NEILANDS, 1985), e assim a disponibilidade de ferro no corpo do hospedeiro infectado é crucial para determinar a habilidade de invasão e proliferação da bactéria em tecidos e fluídos orgânicos (WEINBERG, 1978 in WILLIAMS , 1979). Mesmo em condições limitadas de ferro teremos a síntese de colicina V através do plasmídio COL V, que tem o papel de captar a concentração ideal de ferro, para a bactéria então estabelecer a infecção no hospedeiro (WILLIAMS, 1979; WATERS & CROSA, 1991).

Numerosos plasmídios COL V aumentam a resistência bacteriana aos mecanismos de defesa do hospedeiro (SMITH, 1974), possibilitando a disseminação da bactéria para vários outros sítios podendo esta ser isolada de

urina, sangue e uma variedade de outras fontes extra-intestinais (MINSHEW et al, 1978).

2.6.3 Aerobactina

A habilidade de expressar um sistema de alta afinidade para captação de ferro tem sido relacionada com a virulência em uma variedade de microrganismos patogênicos para animais e humanos (BINDEREIF & NEILANDS, 1983).

A doença produzida por um patógeno seja sistêmica ou localizada, é influenciada pela habilidade em seqüestrar ferro em diferentes sítios do corpo. A importância desse tipo de disponibilidade de ferro age como um modulador de virulência de microrganismo, sendo assim tem recebido considerável atenção (SHARMA et al, 1991).

A produção de aerobactina está relacionada com o aumento da capacidade de captação de ferro, necessário para o transporte de oxigênio bacteriano, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (JOHNSON, 1991).

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência das bactérias, incluindo *E. coli* (MONTGOMERIE et al, 1984). Embora abundante, o ferro é quantitativamente insolúvel em meio aeróbico e em pH biológico (MONTGOMERIE et al, 1984), na maioria das vezes é encontrado intracelularmente e a quantidade extracelular é ligada a glicoproteínas, à qual possui grande afinidade (SHARMA et al, 1991). Isto levou a evolução de um mecanismo especial para a solubilização e transporte deste elemento.

O ferro uma vez em excesso é tóxico e sua assimilação é regulada em nível de membrana em microrganismos, plantas e animais. Em animais o ferro é internamente reciclado entre vários sítios funcionais e lugares de estoque (BINDEREIF & NEILANDS, 1983).

O ferro livre disponível no soro humano é bem limitado, assim a *E. coli* desenvolveu uma variedade de mecanismos para promover a aquisição de ferro

no seu meio ambiente. A *E. coli* possui pelo menos 2 potentes sistemas para aquisição de ferro para permitir ao microrganismo sobreviver no tecido humano com uma quantidade limitada de ferro disponível. Um deles é a produção de hemolisina, que provoca a destruição da membrana do eritrócito liberando o ferro em forma de hemoglobina e o outro sistema é a geração de moléculas de baixo peso molecular chamadas de sideróforos, que são compostos quelantes de ferro que solubilizam e seqüestram o ferro do tecido do hospedeiro para uso da bactéria. Existem 2 tipos de sideróforo, o tipo catecol (enterocolina) é encontrado na maioria das amostras de *E. coli* e o tipo mediado por hidroxamato (aerobactina) é encontrado em algumas amostras (MONTGOMERIE et al, 1984; WILLIAMS & CARBONETTI, 1986; JOHNSON et al, 1988; SHARMA et al, 1991).

A aerobactina foi inicialmente identificada em amostras de *Aerobacter aerogenes* (GIBSON & MAGRATH, 1969 in FERNANDEZ-BEROS et al, 1988) e a enterocolina foi descrita em amostras de *Salmonella typhimurium* (POLLACK & NEILANDS, 1970 in FERNANDEZ-BEROS et al, 1988).

Evidências sugerem que a aerobactina deve ser o principal mecanismo de aquisição de ferro em isolados de *E. coli* extra-intestinal, e a hemolisina deve servir como um mecanismo alternativo na ausência de genes para aerobactina (MONTGOMERIE et al, 1984).

A produção de aerobactina é detectada em grande freqüência em amostras de *E. coli* provenientes da urina e do sangue, mais do que em isolados fecais de indivíduos normais, mostrando que a produção da aerobactina tem um importante papel no fator de virulência em isolados de *E. coli* extra-intestinal (OPAL et al, 1990).

O sistema aerobactina foi o primeiro a ser encontrado associado com plasmídio COL V (WILLIAMS, 1979); o qual foi particularmente prevalente entre as amostras de *E. coli* isoladas de bacteremias em humanos e animais (SMITH & HUGGINS, 1976 in LINGGOOD et al 1987).

Mais tarde foi observado que o sistema aerobactina poderia ser codificado por genes cromossomais ou genes localizados em outros plasmídios diferentes

de COL V (VALVANO & CROSA, 1984, BINDEREIF & NEILANDS, 1985; VALVANO et al, 1986; LINGGOOD et al 1987; MARTINEZ et al, 1987).

O elo entre produção de aerobactina e a presença do plasmídeo COL V é clássica (WILLIAMS, 1979), mas o elo com a resistência bacteriana a antibióticos também tem sido descrita, pois a codificação da produção de aerobactina é encontrada em um mesmo plasmídeo que determina o padrão de resistência aos antimicrobianos (JOHNSON, 1991). Supõe-se que esse plasmídeo poderá servir, no futuro, como um carregador ideal levando a disseminação dos caracteres de resistência, já que as cepas que produzem aerobactina, por serem mais patogênicas, são mais freqüentemente tratadas com antibióticos o que irá levar a uma seleção de cepas resistentes a antibióticos (MARTINEZ et al, 1987).

2.6.4 Pesquisa de Adesinas

A aderência é uma propriedade comum para muitos microrganismos patogênicos incluindo vírus, bactérias Gram positivas e Gram negativas, leveduras e protozoários, pois o patógeno ao aderir a estrutura do hospedeiro evita ser arrastado pelo fluxo normal dos fluídos orgânicos (sangue, urina, conteúdos intestinais). A aderência é considerada o primeiro passo da colonização na superfície da mucosa do hospedeiro e um precedente para a ocorrência da infecção invasiva em muitas situações (JOHNSON, 1991).

A aderência é freqüentemente mediada por uma proteína na superfície da bactéria chamada adesina (TOMISAWA et al, 1989). Existem vários tipos de adesinas que reconhecem receptores específicos na célula uroepitelial do hospedeiro (PERUGINI & VIDOTTO, 1996), e podem ser caracterizadas sorologicamente e classificadas conforme o perfil de hemaglutinação e seus receptores específicos (SVANBORG-EDÉN & HANSON, 1978).

Em 1970, a aderência a célula uroepitelial foi reconhecida pela primeira vez, quando cepas de *E. coli* que causavam ITU aglutinaram eritrócitos humanos na presença de manose. Essas cepas foram reconhecidas como tendo uma hemaglutinação manose resistente (HAMR) (GREEN & THOMAS, 1981). Desde

então as adesinas expressas por *E. coli* uropatogênica têm sido classificadas como hemaglutininas manose sensíveis (MS) ou manose resistentes (MR), dependendo de suas habilidades em aglutinar eritrócitos na presença de compostos com D-manose (HAGBERG et al, 1981). Hemaglutininas MR têm sido ainda subdivididas de acordo com suas especificidades para receptores. Com base nessa especificidade podemos considerar 2 grupos: os que reconhecem os antígenos do grupo sanguíneo P humano (fímbria P) e outra denominada Adesina X ou Fímbria X que possui especificidade para receptores desconhecidos. Um grupo de adesinas X está associado freqüentemente à

E.coli 075, que tem mostrado afinidade com o antígeno do grupo sanguíneo Dr. e parece ser importante nas infecções vesicais (JOHNSON, 1991).

A população bacteriana que causa infecção urinária é heterogênea quanto à expressão de fímbria P. Através de estudos foi verificado que a fímbria P está relacionada com as formas mais severas de infecção urinária, como a pielonefrite (JOHNSON, 1991). Em geral as amostras de *E. coli* que causam pielonefrite freqüentemente possuem fímbria tipo 1 em adição a fímbria P, sugerindo que o tipo 1 deve evidenciar o potencial da fímbria P para infectar o trato urinário superior (LATHAM & STAMM, 1984). Vários autores observaram que em crianças com ITU causadas por *E. coli* tem-se uma forte associação de fímbria P com pielonefrite aguda e que as cepas com o tipo 1 são igualmente freqüentes em todos os tipos de ITU (HAGBERG et al, 1981; VÄISÄNEN et al, 1981; KÄLLENIUS et al, 1981).

HAGBERG et al. (1981) testaram 333 cepas de pacientes de pediatria e observaram que a maioria das *E. coli* expressavam ambas as aglutininas MS e MR, sugerindo que ambas as regiões do trato urinário superior e inferior promovem um meio ambiente apropriado para o crescimento de cepas que podem expressar ambos os tipos de adesinas.

GREEN & THOMAS (1981) mostraram que *E. coli* isolada de urina hemaglutina eritrócitos tipo O humano com muito mais freqüência (56%) que outros isolados urinários testados (81%) como: *Proteus mirabilis*,

Klebsiella pneumoniae e outras espécies de *Proteus*, *Enterobacter* e *Citrobacter* sendo que a *E. coli* é o mais eficiente agente hemaglutinador e deve estar relacionada a grande habilidade do organismo em aderir a superfície da membrana quando comparada com outras enterobacteriaceas.

A capacidade de cepas de *E. coli* hemaglutinar eritrócitos parece estar associada com a virulência (GREEN & THOMAS, 1981). Através da análise da hibridação do DNA realizada em *E. coli* foi mostrado que há um elo entre os genes: hemolisina (hly) e manose resistente (mrh) em alguns isolados. Esses fatores devem ter um papel na colonização e na manutenção do crescimento na área vaginal e periuretral do hospedeiro (LOW et al, 1984).

A aderência bacteriana é manifestada como um fenômeno dinâmico, definido como variação física onde inicialmente a bactéria se associa ao meio urinário, e após mudança de fase ou produção de adesinas adicionais há a adesão às células uroepiteliais e infecção. A bactéria se utiliza desse mecanismo com maior ou menor intensidade de acordo com as adversidades impostas pelos mecanismos de defesa do próprio hospedeiro. Em pacientes com alterações anatômicas e/ou funcionais do aparelho urinário, que se caracterizam pela formação de resíduos urinários ou obstrução ao fluxo, e em pacientes imunocomprometidos, o poder de aderência bacteriana encontra-se diminuído, uma vez que o acesso da bactéria ao aparelho urinário encontra-se facilitado. Da mesma maneira, a infecção em pacientes com aparelho urinário sem anormalidades parece exigir maior poder de aderência por parte do agente etiológico. Estudos têm mostrado que a aderência bacteriana se manifesta com maior intensidade nos momentos que antecedem a colonização do aparelho urinário, diminuindo progressivamente uma vez estabelecida no seu interior (JOHNSON, 1991).

Foi observando que existe um tropismo entre o tecido do hospedeiro e um microrganismo em particular e isso é determinado pela química entre a adesina do microrganismo e a estrutura presente na superfície da célula do hospedeiro. No caso da *E. coli* uropatogênica, existem mecanismos de tropismo: um é relacionado ao desenvolvimento da resposta inflamatória no uroepitélio o qual irá

levar a persistência da bactéria no interior do aparelho urinário, e outro no qual a bactéria se comporta como componente da microbiota intestinal normal (MAHMOOD et al, 2000).

A adesão da *E. coli* através da fímbria do tipo 1 é bloqueada por soluções de D - manose ou alfa - metilmanose, mas não por soluções de outros monossacarídeos ou seus derivados (DUGUID & GILLIES, 1957 in JOHNSON, 1991). As cepas que carregam apenas a fímbria do tipo 1 aderem fracamente as células epiteliais do trato urinário humano, e assim, são mais suscetíveis aos mecanismos de defesa do hospedeiro, pois freqüentemente esta ligação é desfeita na presença da glicoproteína de TAMM-HORSFALL, que contém frações de manose na sua constituição. Ocorrendo a ligação bactéria - glicoproteína, este complexo é eliminado na urina (HAGBERG et al, 1981; JOHNSON, 1991).

A expressão de fímbrias P em *E. coli* isoladas de ITU declina progressivamente de 70% entre as bactérias isoladas em pielonefrite, para 36% nas bactérias causadoras de cistite, 24% nas bactérias encontradas em amostras de urina de portadores de bacteriúria assintomática e 19% em *E. coli* da microbiota intestinal (JOHNSON, 1991).

Os receptores para fímbria P podem ser encontrados em células epiteliais e não epiteliais do rim e de todo o aparelho urinário. Também são encontradas em células do intestino grosso, o que pode explicar o achado freqüente da *E. coli* pielonefritogênica em nível intestinal (LATHAM & STAMM, 1984).

Aproximadamente, de 5 a 10% das *E.coli* isoladas das fezes humanas contém um operon, que é uma estrutura que codifica a biossíntese e expressão funcional da fímbria P. Estudos atuais revelaram que este operon está presente em 90% das *E.coli* isoladas de pacientes com pielonefrite aguda (MAHMOOD et al, 2000).

2.6.5 Genes de Virulência

A adesão bacteriana à células uroepiteliais é promovida através das adesinas, as quais, podem ou não estar associadas a fímbria. Essas adesinas podem ser diferenciadas usando métodos fenotípicos e genotípicos (BLANCO et al, 1997). A presença de múltiplas adesinas permite ao patógeno o reconhecimento de vários receptores ao longo do trato urinário e deve ser um importante fator para o desenvolvimento da patogenicidade (GUIGNOT et al, 2000).

Vários genes são responsáveis pela expressão de fatores de virulência como: produção de hemolisina, produção de aerobactina, soro resistência e biossíntese das adesinas de *E.coli* uropatogênica (BLUM et al, 1994).

Em geral, cepas de *E. coli* que possuem esses traços fenotípicos carregam tipicamente um bloco de genes chamado de ilhas de patogenicidade (PAIs) (GUYER et al, 2001).

As PAIs foram primeiramente definidas por HACKER et al. (1983), e foram encontradas em uma região do DNA (> 30 kb) que está associada com organismos patogênicos e não são comumente encontrados no genoma de *E.coli* fecal.

GUYER et al. (2001) identificaram 2 tipos de PAI: PAI I, a qual carrega o “operon” para os genes *pap* e *hly* os quais codificam fímbria P e hemolisina, respectivamente, e PAI II, que possui uma segunda cópia do operon *pap*, genes envolvidos no transporte de ferro e os que codificam o auto - transporte e secreção de toxinas (BAUER et al, 2002).

Alguns dos genes encontrados nas PAIs são denominados de *pap* (pili associado a pielonifrite), *sfa* (adesina S fímbria) e *afa* (adesina afimbrial) os quais são transcritos em um único segmento de RNA mensageiro e regulados por um conjunto de seqüências comuns de DNA (um operon). Os operons são comumente encontrados, em sua maioria codificando P ou F, S e Afa (também designada Dr hemaglutinina) adesinas, respectivamente (BLANCO et al, 1997).

A fímbria P possui várias subunidades uma maior que é a Pap A e três menores, Pap E, Pap F e Pap G (estão situadas exclusivamente na extremidade da fímbria). A Pap A é necessária para a formação da fímbria mas não para a aderência, já a Pap F e Pap G são necessárias para adesão específica a receptores digalactosídeos, a Pap E está relacionada com o ancoramento das adesinas específicas a fímbria. Sendo assim, pode-se observar que o operon *pap* representa uma constelação complexa de genes que codificam os constituintes da fímbria Pap, ou codificam proteínas envolvidas na sua regulação (JOHNSON, 1991).

A adesina afimbrial (AFA) é dividida em 2: AFA I e AFA II, as quais são estruturalmente distintas de todas as outras adesinas de *E. coli* e semelhantes a uma malha fina e não são visíveis em microscopia eletrônica (JOHNSON, 1991).

A adesina Pap G vem a ser o maior fator de virulência de *E. coli* uropatogênica, pois promove a adesão bacteriana a células uroepiteliais. Pap G pode ser dividido em 3 subclasses (I, II e III). A classe II tem sido mostrada ser a mais predominante em cepas de *E. coli* que causam pielonefrite e a classe III é encontrada em cepas que causam cistite (JANTUNEN et al, 2000).

JANTUNEN et al. (2000) estudaram a fímbria P de *E. coli* e observaram que *pap G* classe II alelo está fortemente associado com crianças que apresentam uma anatomia normal do trato urinário ou uma anormalidade anatômica insignificante no trato urinário com pielonefrite. Isto indicou uma associação de fímbria P em crianças com pielonefrite não obstrutiva (KALLENIOUS et al, 1981).

Cepas de *E. coli* que perdem o gene fímbria P foram encontradas mais freqüentemente em crianças com significativa anormalidade clínica no trato urinário. Esta similaridade indica que cepas de *E. coli* sem o gene *pap G* são menos virulentos e podem causar infecções somente em certos grupos de crianças (KALLENIOUS et al, 1981).

Alguns estudos revelaram que existe uma alta freqüência do alelo *pap G* classe III somente em crianças com anormalidades do trato urinário. JANTUNEN et al. (2000) estudando esses genes, observaram uma associação de cistite em

crianças com urosepticemia em adultos, concluindo que deve existir uma relação entre alelo *pap* G classe II e alelo *pap* G classe III com casos de urosepticemia (JANTUNEN et al, 2000).

Os genes de virulência estão presentes em cepas isoladas de crianças com cistite ou pielonefrite, porém a sua presença é menor em casos de cistite (KALLENIOUS et al, 1981).

MITSUMORI et al. (1999) realizaram um experimento para observar as características urovirulentas de *E. coli* em pacientes com prostatite aguda e pielonefrite, relacionando a presença dos genes de virulência (*sfa*, *foc*, *pap* G alelo III) juntamente com a produção de alfa hemolisina e fator necrozante citotóxico (CNF). Tanto em prostatite como em pielonefrite verificaram a expressão de fatores de virulência similares (exceto para isolados de prostatite que apresentavam alta porcentagem de cepas não hemolíticas). O alelo *pap* G III e gene *foc* são mais freqüentes que o alelo *pap* G II no caso da pielonefrite.

NORMARK et al. (1983) ao trabalharem com cepas de *E. coli* J96, observaram que existia uma relação entre cepas HAMR que também expressavam o gene *pap*, demonstrando um possível papel do gene *pap* em um fenótipo HAMR positivo (GUIGNOT et al, 2000).

Muitos trabalhos foram feitos analisando ITU em mulheres e crianças, sendo que as mulheres são influenciadas por muitos fatores não presentes em pacientes de pediatria, incluindo: intercurso sexual, práticas anticonceptivas, alterações na aderência bacteriana mediada por hormônios, propiciando uma chance maior em desenvolver uma ITU, em virtude dessas diferenças, o papel dos fatores de virulência bacteriano em mulheres deve diferenciar-se do papel desses mesmos fatores de virulência em crianças (STAPLETON et al, 1991).

STAPLETON et al. (1991) ao analisar mulheres com cistite observaram que 80% dos isolados apresentavam 1 ou mais genes de virulência. Essa análise mostrou que 51% dos isolados de cistite apresentavam 2 ou mais genes de virulência. Os isolados expressando adesina F (41%) eram mais comuns que os que expressavam fímbria P (24%). A expressão de fímbria P isoladamente foi bastante incomum entre as crianças, no entanto a expressão de adesina F

isoladamente foi mais comum em isolados de mulheres adultas (26) do que em crianças com cistite (4%).

A relativa raridade da expressão de apenas fímbria P (*pap*) em adultos ou crianças com cistite sugere que esta adesina deve conferir algum grau de tropismo renal para amostras de *E. coli* que possuem essa particularidade (KALLENIIUS et al, 1981).

BLANCO et al. (1997) analisaram 243 cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU quanto à presença de *pap*, *sfa* e *afa* através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), e encontraram que 54%, 53% e 2% das cepas expressavam o genótipo *pap*, *sfa* e *afa* respectivamente. Os resultados fenotípicos também foram correlacionados com HAMR e produção de alfa hemolisina (Hly) e fator necrozante citotóxico tipo 1 (CNF1). Concluíram que as amostras de *E. coli* uropatogênicas geralmente produzem toxinas (Hly e/ou CNF1) e possuem os genes de virulência *pap* e ou *sfa*. As amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com pielonefrite aguda possuem os genes *pap* e *sfa* com frequência maior do que aquelas isoladas de pacientes com cistite ou bacteriúria assintomática. Os resultados indicam que *pap* e *sfa* devem ter um importante papel no desenvolvimento e severidade da ITU.

JOHNSON & STELL (2000) ao estudarem a distribuição dos fatores de virulência, verificaram que os mesmos encontravam-se disseminados na população, o que sugere uma inserção contínua entre as amostras de *E. coli*, por outro lado também existe a hipótese de uma disseminação através de uma transferência horizontal (CULHAM & WOOD, 2000).

Um fator de virulência que merece atenção é a presença dos PAIs em várias amostras, e que devem ter sofrido um processo evolucionário para adaptar-se no hospedeiro humano mantendo genes e tendo um comportamento uropatogênico ou perdendo genes e tendo um comportamento não uropatogênico. Essa idéia é sustentada pelo fato de que todas as cepas com somente um tipo de operon (*pap* ou *sfa*) apresentam uma fraca aderência bacteriana na célula uroepitelial e a presença de mais que um operon fímbrial

aumentava a força da aderência da bactéria a célula uroepitelial , aumentando a chance da bactéria causar infecção no hospedeiro (SILVEIRA et al, 2001).

2.7 Terapêutica Antimicrobiana

Em 1905 Paul Ehrlich demonstrou a possibilidade da síntese de certas substâncias capazes de danificar especificamente as células do microrganismo infectante, sem prejuízo para a saúde do hospedeiro. Ehrlich introduziu o conceito de índice quimioterápico - relação entre a dose máxima tolerada e a dose mínima curativa: o que propriamente caracteriza a quimioterapia é o emprego de substâncias dotadas de alto parasitotropismo e baixo organotropismo, portanto de índice quimioterápico elevado (BIER, 1985).

A quimioterapia antimicrobiana começou em 1935, com a descoberta das sulfonamidas. Em 1940, foi demonstrado que a penicilina, descoberta em 1929, poderia ser uma substância terapêutica eficaz. Durante os 25 anos seguintes as pesquisas de agentes quimioterápicos concentraram-se nas substâncias de origem microbiana, denominadas de antibióticos. O isolamento, a concentração, a purificação e a produção da penicilina em grande escala foram sucedidos pelo desenvolvimento da estreptomina, das tetraciclina, do cloranfenicol e de muitos outros agentes. Essas substâncias foram originalmente isoladas dos filtrados dos respectivos cultivos de bolores. Posteriormente, outros antibióticos foram sintetizados e, nesses últimos anos, a modificação biossintética das moléculas passou a constituir um método promissor na elaboração de agentes antimicrobianos novos (JAWETZ et al, 1998).

Antes que um antibiótico possa agir, ele deve interagir primeiro com alguma parte do microrganismo patogênico em um hospedeiro. A interação pode ser iniciada por um processo de transporte ativo específico da célula, que serve para aumentar a concentração intracelular "livre" do antibiótico, além daquela que seria atingida por difusão passiva. A concentração intracelular do antibiótico é determinada pelo equilíbrio entre influxo e efluxo, não havendo necessidade de

ligação específica da droga a nenhum componente intracelular (JAWETZ et al, 1998).

A explicação de como o antibiótico atua, envolve um ou mais fenômenos biofísicos ou bioquímicos muito específicos, que ocorrem na bactéria. Para o sucesso da quimioterapia é preciso que o processo metabólico a ser atacado no microrganismo seja o mais diferente possível do hospedeiro, e que a lesão real que faz ou pode ser feita ao paciente pelo antimicrobiano deve ser pesada em função do grau de risco para sua vida (YOUMANS et al, 1983).

O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente elucidado. Todavia, esses mecanismos podem ocorrer através da inibição da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de proteínas (inibição da tradução e transcrição do material genético) ou inibição da síntese de ácidos nucléicos (JAWETZ et al, 1998).

2.7.1 Grupos de antimicrobianos

1) Betalactâmicos

Os betalactâmicos são compostos que contêm um núcleo básico comum, o anel betalactâmico. Todos os betalactâmicos atuam inibindo a síntese de parede celular bacteriana e, portanto, são ativos contra bactérias em crescimento. Esta inibição constitui apenas uma das atividades desses agentes, embora seja a mais compreendida. A etapa inicial na ação farmacológica consiste na ligação do fármaco aos receptores celulares (“proteínas de ligação da penicilina”, PBSs ou penicillin - binding proteins), logo a reação de transpeptidação é inibida, e a síntese de peptidoglicano é bloqueada. A próxima etapa provavelmente envolve a remoção ou inativação de um inibidor de enzimas autolíticas na parede celular. Isso ativa a enzima lítica e resulta em lise, se o ambiente for isotônico. Num meio acentuadamente hipertônico, as bactérias transformam-se em protoplastos ou esferoplastos, envolvidos apenas pela

membrana celular. Existem vários tipos de PBPs e cada antibiótico pode ter especificidade maior por um ou vários tipos de PBP. Por atuarem na mesma membrana, porém em sítios diferentes, tais antibióticos, quando associados, podem demonstrar efeito aditivo. As PBPs estão sob controle cromossômico, e a ocorrência de mutações pode alterar seu número ou sua afinidade por fármacos betalactâmicos (JAWETZ et al, 1998).

São considerados betalactâmicos os seguintes antibióticos: penicilina (Ampicilina), cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina), 2ª geração (cefuroxima e cefoxitina), 3ª geração (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), 4ª geração (cefepima), monobactâmico (aztreonam) e carbapenem (imipenem).

2) Aminoglicosídeos

Quimicamente os aminoglicosídeos consistem em um aminoaçúcar e em uma estrutura em forma de anel denominada aminociclitol (PELCZAR Jr. et al, 1997).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos consiste em induzir a síntese anormal de proteínas que se dá através de quatro etapas. A primeira etapa consiste na ligação do aminoglicosídeo a uma proteína receptora específica localizada na subunidade 30S do ribossoma microbiano. Na segunda etapa, o aminoglicosídeo bloqueia a atividade do “complexo de iniciação” para formação de peptídeos. Na terceira etapa, a leitura da mensagem do RNAm é feita equivocadamente na “região de reconhecimento” do ribossoma; em consequência, ocorre inserção de um aminoácido errado, no peptídeo, resultando numa proteína não funcional. Na quarta etapa, a ligação do aminoglicosídeo resulta na quebra dos polissomas e sua separação em monossomas incapazes de sintetizar proteínas. Essas atividades ocorrem de forma mais ou menos simultânea, e o efeito global consiste geralmente num evento irreversível: a morte da bactéria (JAWETZ et al, 1998).

São considerados aminoglicosídeos os seguintes antibióticos: amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina entre outros.

3) Tetraciclina

Estes são antibióticos de amplo espectro, com um sistema de anel complexo. As tetraciclina formam um complexo insolúvel com diversos íons metálicos e a má - absorção das tetraciclina administradas por via oral pode ser devida a interação com o cálcio ou outros sais presentes na dieta (YOUMANS et al, 1983).

O mecanismo de ação das tetraciclina ocorre através da inibição da síntese protéica a nível ribossômico. Elas atuam nos ribossomos bacterianos e de mamíferos, mas têm sua ação mais intensa na subunidade 30S dos sistemas bacterianos. A inibição da síntese protéica se dá ao bloquear a ligação do aminoacil RNAt ativado. Desta maneira, as tetraciclina impedem a introdução de novos aminoácidos na cadeia peptídica em início. A ação é inibida e reversível com a remoção do fármaco, podendo-se afirmar que as tetraciclina possuem um efeito bacteriostático (JAWETZ et al, 1998).

4) Quinolonas

O ácido nalidíxico, sintetizado na década de 1960, foi a primeira quinolona a ser comercializada e, assim como seus derivados (ácido oxolínico, cinoxacina, ácido pipemídico e rosoxacina), foi largamente utilizado no tratamento de infecções simples do trato urinário, uma vez que somente se concentrava terapêuticamente neste sistema. Embora ainda sejam muito utilizadas na prática médica, as quinolonas foram substituídas com vantagens, pelas fluorquinolonas desenvolvidas na década de 80.

A norfloxacina foi a primeira fluorquinolona lançada no mercado, e suas indicações se limitaram às infecções do trato urinário e gastrintestinais. As demais fluorquinolonas existentes em nosso meio (perfloxacina, ciprofloxacina,

ofloxacina, lomefloxacin e sparfloxacina) possuem vantagens do ponto de vista farmacocinético, pois são capazes de atingirem concentrações terapêuticas na maioria dos órgãos e sistemas.

O mecanismo de ação das quinolonas ocorre por inibição de uma enzima chamada DNA - girase, responsável pelo processo de superespirilamento do DNA bacteriano para que o mesmo possa ser acomodado dentro da célula bacteriana em divisão. Deste modo, a falta de DNA - girase faz com que o DNA fique alongado, destruindo a bactéria. São, portanto, bactericidas (LOMAR & DIAMENT, 1998).

5) Sulfonamidas

As sulfas foram introduzidas na terapêutica em meados da década de 1930, e foram os primeiros antimicrobianos eficazes. Elas demonstraram ser ativas contra uma ampla gama de bactérias. Os antibióticos descobertos desde então têm sido mais utilizadas devido à sua maior potência e ao fato de que as bactérias desenvolvem rápida resistência aos sulfamídicos. Contudo, as sulfas, são amplamente empregadas no tratamento de infecções urinárias (YOUMANS et al, 1983).

Todas as sulfonamidas têm a mesma estrutura central, e diferem uma das outras em algumas partes da molécula. A estrutura principal é importante porque se assemelha à estrutura de um composto bioquímico natural denominado ácido para-aminobenzoico (PABA). Muitas bactérias requerem o PABA como um precursor de uma co-enzima essencial denominada ácido tetraidrofólico (THFA). As bactérias necessitam do THFA para sintetizar aminoácidos e timidina, um componente essencial ao DNA.

Por se assemelharem ao PABA, as sulfonamidas são denominadas análogos estruturais ou formas “falhas” de PABA. As enzimas bacterianas podem muitas vezes ser enganadas, utilizando um análogo estrutural de um substrato

em vez do próprio substrato. Isto geralmente resulta em uma inibição competitiva da atividade da enzima. No caso da sulfonamida, uma enzima bacteriana denominada diidropteroato sintetase utiliza a sulfanomida em vez do PABA. O resultado final é que o THFA não será produzido pela célula, sendo assim as sulfonamidas podem ser considerados compostos bacteriostáticos (JAWETZ et al, 1998).

As sulfonamidas atualmente são combinadas com o trimetoprim que é um agente antibacteriano sintético análogo estrutural da porção pteridina do ácido diidrofólico (DHFA) e uma enzima bacteriana denominada diidrofolato redutase que pode ser facilmente enganada, utilizando-se o trimetoprim em vez do DHFA. As sulfonamidas e o trimetoprim quando utilizados em combinação, produzem bloqueio seqüencial, resultando um acentuado aumento do efeito bactericida (PELCZAR Jr. et al, 1997).

6) Nitrofuranos

O composto original do qual os nitrofuranos são derivados é o furfural. O furfural pode ser preparado a partir de espigas e caules de milho, da casca da aveia e de outros subprodutos vegetais. A estrutura ácida, que constitui a maior parte de uma molécula furfural é o anel furânico.

O furfural e outros compostos de anel furânico tem pouca atividade antimicrobiana. Mas em 1944, dois microbiologistas americanos, DODD & STILLMAN (in PELCZAR jr. et al, 1997), descobriram que uma propriedade antibacteriana acentuada poderia ser conferida a estes compostos pela adição de um grupo nitro (-NO₂) ao anel furânico, criando assim um nitrofurano, desde então muitos tipos de nitrofuranos têm sido sintetizados.

A nitrofurantoína é um quimioterápico do grupo dos nitrofuranos que age inibindo a síntese protéica e a respiração celular e é capaz de danificar o DNA da célula bacteriana. A ação bactericida é exercida pela redução da nitrofurantoína por uma redutase presente na bactéria. (PELCZAR Jr. et al, 1997).

2.7.2 Resistência as Classes de Antimicrobianos:

1. Betalactâmicos

A resistência bacteriana aos betalactâmicos pode ocorrer por 3 mecanismos:

- Produção pela bactéria de enzimas inativadoras do anel betalactâmico denominadas betalactamases que podem ser de dois tipos: induzidas por plasmídeo ou cromossômicas. Alguns antibióticos deste grupo podem induzir com maior (cefotaxima) ou menor (ampicilina) frequência a produção destas enzimas, assim como apresentarem maior (imipenem) ou menor (penicilina G) resistência a ação catalítica das betalactamases.

- Diminuição da permeabilidade da parede celular bacteriana, por mutação de canais porina.

- Mutação cromossômica das PBPs (LOMAR & DIAMENT, 1998).

2. Aminoglicosídeos

A resistência aos aminoglicosídeos pode ser cromossômica, e está associada a uma perda ou alteração de uma proteína específica na subunidade 30S do ribossoma bacteriano, que atua como sítio de ligação em microrganismo suscetíveis. Além disso, microrganismos como bactérias Gram - negativas podem se tornar resistentes a aminoglicosídeos (devido a um plasmídeo) produzindo enzimas de adenilação, fosforilação ou acetilação que destroem os fármacos. Essas são enzimas inativadoras. Um terceiro tipo de resistência consiste num “defeito de permeabilidade”, ou seja, uma alteração da membrana externa que reduz o transporte ativo do aminoglicosídeo para o interior da célula, de modo que o fármaco é incapaz de atingir o ribossoma. Com frequência essa resistência é mediada por plasmídios (JAWETZ et al, 1998).

3. Tetraciclinas

A resistência as tetraciclinas ocorre quando os microrganismos modificam sua permeabilidade ao fármaco, desta forma a resistência resulta das alterações na permeabilidade do envoltório celular microbiano. Nas células resistentes, o fármaco não é transportado ativamente para o interior da célula, ou é rapidamente excluído sem atingir concentrações inibidoras. Frequentemente, esta resistência é controlada por plasmídios (JAWETZ et al, 1998).

4. Quinolonas

A resistência bacteriana às quinolonas surge por processo de mutação da enzima DNA - girase ou por diminuição da permeabilidade da parede celular (LOMAR & DIAMENT, 1998).

5. Sulfonamidas e Trimetoprim

Os microrganismos resistentes a sulfonamidas desenvolvem uma via metabólica alternativa que se desvia da reação inibida pelo fármaco.

No caso do trimetoprim os microrganismos resistentes elaboram uma enzima modificada que tem a capacidade de desempenhar sua função metabólica, embora seja menos afetada pelo fármaco do que a enzima no microrganismo suscetível (JAWETZ et al, 1998).

De modo geral a resistência a agentes antimicrobianos pode ocorrer através de numerosos mecanismos:

- os microrganismos produzem enzimas que destroem o fármaco ativo.
- Os microrganismos desenvolvem um alvo estrutural alterado para o fármaco.

- Os microrganismos desenvolvem uma via metabólica alternativa, que se desvia da reação inibida pelo fármaco.

- Os microrganismos elaboram uma enzima modificada que ainda tem a capacidade de desempenhar sua função metabólica, embora seja menos afetada pelo fármaco do que a enzima no microrganismo suscetível.

2.7.3 Origem da Resistência

A origem da resistência aos fármacos pode ser:

-**Origem não genética:** em geral, a replicação ativa das bactérias é necessária para a maioria das interferências dos agentes antibacterianos. Conseqüentemente, os mecanismos que estão metabolicamente inativos (sem multiplicação) podem ser fenotipicamente resistentes aos fármacos. Todavia, os descendentes são totalmente suscetíveis.

Os microrganismos podem perder a estrutura do alvo específico para um fármaco em várias gerações, tornando-se assim, resistentes.

- **Origem genética:** a maioria dos microrganismos resistentes a fármacos surge em conseqüência de alterações genéticas e processos subseqüentes de seleção pelos agentes antimicrobianos. Podemos ter 2 tipos:

* Resistência cromossômica: desenvolve-se em conseqüência de mutação espontânea em um locus que controla a suscetibilidade a determinado agente antimicrobiano. A presença do antimicrobiano atua como mecanismo seletivo, suprimindo os microrganismos suscetíveis e permitindo o crescimento dos mutantes resistentes aos fármacos.

* Resistência extracromossômica: as bactérias quase sempre contêm elementos genéticos extracromossômicos denominados de plasmídios que transportam genes para resistência a um ou, quase sempre, vários agentes antimicrobianos. Genes plasmidiais para a resistência antimicrobiana freqüentemente controlam a formação de enzimas destruidoras desses agentes antimicrobianos.

O material genético e os plasmídios podem ser transferidos através: transdução, transformação, conjugação ou transposição (JAWETZ et al, 1998).

A descoberta e o desenvolvimento de novas drogas têm aumentado desde 1950 e um aumento significativo ocorreu entre 1960 e 1990.

Em 1950 ocorreu a introdução da tetraciclina; 1960 das cefalosponinas de 1ª geração e o ácido nalidíxico; em 1970 das cefalosporinas de 2ª geração e a sulfametoxazol - trimetoprim; em 1980 as cefalosporinas de 3ª geração e fluorquinolonas. Neste período muitas drogas foram descobertas e sintetizadas, as quais apresentavam um largo espectro atingindo patógenos Gram positivos e negativos, além disso, eram capazes de penetrar sistemicamente em numerosos tecidos e em variados tipos de infecção através da administração oral, parenteral ou ambas (BLONDEAU & VAUGHAN, 2000).

A resistência a antibióticos é um problema que tem sido observado em países subdesenvolvidos e também em países desenvolvidos. Recentemente, ocorreu um grande número de epidemias provocadas por organismos com múltipla resistência. Um bom exemplo disso aconteceu no Sudão, onde a infecção bacteriana do trato urinário e gastrointestinal é comum e representa a causa freqüente de morbidade em pacientes ambulatoriais, bem como, em infecções nosocomiais. A maioria das infecções é tratada empiricamente e devido a isto, inúmeros estudos indicaram um aumento da resistência aos antimicrobianos (AHMED et al, 2000).

Assim é de fundamental importância saber qual o microrganismo que causa a infecção e o seu perfil de susceptibilidade para então propor a seleção e o uso do antimicrobiano adequado (AHMED et al, 2000)

2.7.4 Antimicrobianos usados na nutrição animal

Os antimicrobianos têm sido usados na ração de animais na América do Norte e Europa há quase 50 anos. As drogas mais comuns são administradas também em seres humanos como: penicilinas, cefalosporinas e fluorquinolonas. Esses antimicrobianos são incorporados na ração animal como terapia massal para infecção ou na ausência de doença é utilizado como fator de crescimento, que tem como objetivo promover um crescimento eficiente do animal. Nos Estados Unidos 50% de todos os antimicrobianos produzidos são administrados em animais, a maioria como subterapia (GORBACH, 2001; PELCZAR et al, 1997).

A transferência de *E.coli* através dos alimentos é comum e tem sido demonstrada por vários grupos de pesquisa, que alertam que o uso de antimicrobianos na ração animal seleciona cepas resistentes e asseguram a sua persistência no meio ambiente (CORPET; 1988; SMITH; 1969). Essa persistência ocorre devido à transferência horizontal que se dá entre a bactéria ingerida e as bactérias comensais da microflora intestinal humana, logo esses microrganismos servem como reservatório de genes de resistência que podem ser transferidos para outros membros da microflora ou para uma bactéria patogênica (GORBACH, 2001; JOHNSON et al, 2001 b).

Os antimicrobianos só devem ser utilizados em animais quando houver indicação terapêutica e deve ser recomendado por um médico veterinário habilitado para tal prática, devendo ser banido a administração de drogas de interesse para o homem como: fluorquinolonas e cefalosporinas (3º geração), para que no futuro não tenhamos um risco definitivo a saúde humana determinado pelo uso de concentrações subterapêuticas na ração animal (GORBACH, 2001).

3. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Detectar cepas de ExPEC (*Escherichia coli* patogênica extra-intestinal) em açougues através da coleta de carne moída (CM), *swabs* de moedor de carne (MC) e mãos de manipuladores de alimentos (MM).

- 2) Observar a incidência dos fatores de virulência como: produção de hemólise, produção de colicina, produção de aerobactina, pesquisa de adesinas através da técnica hemaglutinação e presença de genes de patogenicidade (*pap*: pili associada a pielonefrite; *sfa*: adesina S fímbria e *afa*: adesina afimbrial).

- 3) Avaliar o perfil de resistência de cepas de ExPEC frente a várias classes de antimicrobianos.

4. Material e métodos

4.1 Origem das Amostras

As amostras analisadas neste estudo foram provenientes de 23 estabelecimentos como: açougues, supermercados e mercearias da cidade de Taquaritinga (interior do estado de São Paulo). O estudo foi desenvolvido através da coleta de 200 g de amostra total de carne moída, 23 *swabs* do moedor de carne (MC) e 23 *swabs* das mãos dos manipuladores de carne (MM), no período de março/2004 a janeiro de 2005.

4.2 Coleta da Amostra

Para a coleta da amostra foram utilizados *swabs* estéreis previamente umedecidos com água peptonada esterilizada nos quais foram cuidadosamente passados nas mãos dos manipuladores (superfície das mãos, entre os dedos, debaixo das unhas) e no moedor de carne. A carne moída foi colocada no próprio “saco do consumidor”, todas as amostras coletadas foram acondicionadas em uma caixa térmica contendo gelo e transportadas para o laboratório, para serem processadas no mesmo dia. Foram coletadas 69 amostras (carne moída, moedor de carne e mãos dos manipuladores), destas foram isoladas 287 cepas de *E.coli*, nas quais 5 cepas foram caracterizadas como ExPEC.

4.3 Isolamento e Identificação das cepas de *E.coli*

As amostras de carne moída foram preparadas pesando-se assepticamente 25 g da mesma, em erlenmeyer (500 ml) contendo 225 ml de água peptonada esterilizada. Homogeneizou-se, obtendo-se desta maneira a diluição inicial de 10^{-1} . A partir desta diluição decimal foram preparadas as demais diluições decimais sucessivas no mesmo diluente (10^{-2} e 10^{-3}). Nos swabs do moedor de carne e das mãos do manipulador foram também realizadas diluições decimais sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) utilizando água peptonada esterilizada.

Após as diluições, iniciou-se o teste presuntivo utilizando alíquotas de 1 ml das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em série de 3 tubos contendo 9 ml de caldo lauril sulfato de sódio, obtendo-se diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Esses tubos continham o tubo de Durham invertido, e foram incubados a 35°C por 24 a 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação do meio e formação de gás no interior dos tubos de Durham.

Para realização dos testes confirmatórios, foi transferida uma alça de semeadura de platina, culturas dos tubos positivos para os tubos contendo caldo verde brilhante (neste meio a bile e o verde brilhante inibem o desenvolvimento da flora acompanhante dos coliformes), com tubos de Durham invertidos, e foram incubados a 35°C por 48 horas, nos quais ocorreu a pesquisa de coliforme total. Concomitantemente, foi transferida uma alça de semeadura de platina as culturas positivas para o caldo EC (é um caldo que contém sais biliares que inibem o desenvolvimento da microbiota acompanhante dos coliformes e permite o crescimento de *E.coli*), contendo tubo de Durham invertido, e foi incubado a 45,5°C em banho-Maria durante 24 a 48 horas. Após a incubação anotaram-se os tubos que apresentaram resultado positivo (formação de bolhas de gás nos tubos de Durham e turvação do meio de cultura).

As amostras positivas foram semeadas em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), com auxílio de uma alça de platina flambada e fria. Essas placas de Petri contendo EMB, após inoculação, foram incubadas a 37°C por 24 horas. A presença de colônias

azuis negras com centro negro e bordas claras à luz transmitida, ou brilho metálico esverdeado à luz refletida é indicativo de *E.coli*.

Colônias aparentemente com suspeita de *E.coli* foram submetidas à série bioquímica onde posteriormente, foram semeadas com auxílio de uma agulha de semeadura em meio Tríplice de açúcar e ferro (TSI) picando-se o meio até o fundo do tubo e fazendo estrias no ápice e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura mostrou uma identificação presuntiva de *E.coli* com a fermentação dos 3 açúcares existentes no TSI (lactose +, sacarose +, glicose +, com produção de gás). A fermentação desses açúcares levou a produção de ácidos e modificou a cor do TSI passando de alaranjado (cor original do meio) para amarelo. A confirmação foi realizada com a série bioquímica (indol +, citrato de Simmons -).

Para testar o indol, o microrganismo foi inoculado com auxílio de uma agulha de semeadura em tubos de vidro contendo o caldo triptofano, e incubado a 37°C por 24 horas. Ao término desse período, foram adicionadas 15 gotas do reativo de Kovac pela parede do tubo. O desenvolvimento de uma cor vermelha fúcsia brilhante na superfície de contato entre o reativo e o caldo triptofano segundos após a adição do reativo indicou a presença de indol - prova positiva. Foi utilizado como controle positivo dessa prova *E.coli* e como controle negativo *Klebsiella pneumoniae*.

Para testar a capacidade da bactéria de utilizar o citrato, como única fonte de carbono, o microrganismo foi inoculado com auxílio de uma agulha de semeadura em uma única estria na superfície do meio (citrato de Simmons), em seguida o tubo foi incubado a 37°C por 24 horas. Ao término desse período foi realizada a leitura da prova onde o não crescimento ao redor da linha de semeadura deixando o meio inalterado indicou prova negativa. Foi utilizado como controle positivo dessa prova *Enterobacter aerogenes* e como controle negativo *E.coli* (EDWARDS & EWING, 1972 ; BERGEY'S manual,1994).

4.3.1 Meios de Cultura para Isolamento e Identificação de *E.coli*

A) Caldo Lauril Sulfato de Sódio - BIOBRÁS

Composição: Formulação (g/l) - pH final: 6,8

Cloreto de sódio.....	5,00
Fosfato bibásico de potássio.....	2,75
Fosfato monobásico de potássio.....	2,75
Lactose.....	5,00
Lauril sulfato de sódio.....	0,1
Peptona de caseína.....	20,00

Segundo as instruções do fabricante; 35,6 g do meio de cultura foram reidratados com 1000 ml de água destilada e aquecido ligeiramente. Distribuídos em tubos contendo tubos de Durham, de acordo com a quantidade de inóculo. Esterilizados a 121°C por 15 minutos (não abrir a autoclave antes da temperatura atingir 75°C para evitar a entrada de bolhas de ar nos tubos de Durham).

Este meio é recomendado pela APHA (1992) (American Public Health Association) para detecção de coliformes em alimentos.

B) Caldo Verde Brilhante (Bile 2%) – BIOBRÁS

Composição: Formulação (g/l) – pH final: 7,2

Bile bovina.....	20,0
Lactose.....	10,0
Peptona de gelatina.....	10,0
Verde brilhante.....	0,0133

Foram dissolvidos 40 g em 1 litro de água destilada e posteriormente distribuídos em tubos contendo tubos de Durham, de acordo com a quantidade de inóculo. Esterilizou a 121°C por 15 minutos(não abrir a autoclave antes da temperatura atingir 75°C, para evitar a entrada de bolhas de ar nos tubos de Durham).

Esse meio de cultura seletivo é recomendado pela APHA (1992) para pesquisar coliformes em alimentos de importância sanitária.

C) Caldo EC – BIOBRÁS

Composição: Formulação (g/l) – pH final: 6,9

Cloreto de sódio.....	5,0
Fosfato bibásico de potássio.....	4,0
Fosfato monobásico de potássio.....	1,5
Lactose.....	5,0
Peptona de caseína.....	20,0
Sais biliares nº3.....	1,5

Segundo o fabricante deve-se dissolver 37 g em 1 litro de água destilada. Distribuir em tubos contendo tubos de Durhan de acordo com a quantidade de inóculo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Este meio é recomendado pela APHA (1992) para detecção de coliformes fecais em alimentos

D) Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) – BIOBRÁS

Composição: Formulação (g/l) – pH final: 7,2

Agar bacteriológico.....	13,5
Azul de metileno.....	0,065
Eosina Y.....	0,4

Fosfato bibásico de potássio.....	2,0
Lactose.....	5,0
Peptona de gelatina.....	10,0
Sacarose.....	5,0

Segundo o fabricante deve-se dissolver 36g em 1 litro de água destilada. Aquecer frequentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, esfriar até 45 a 50°C. Distribuir em placas de Petri estéril . Após solidificar o meio deve ser armazenado de 2 – 8°C.

Este meio é uma modificação da fórmula de Holt-Harris e Teague usada para isolamento e diferenciação de enterobactérias.

E) Ágar Tríplice de Açúcar e Ferro (Triple Sugar Iron Agar) - OXOID

Composição: Formulação (g/l) - pH final: 7,4

Extrato de carne.....	3,00
Extrato de levedura.....	3,00
Peptona.....	20,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Lactose.....	10,00
Sacarose.....	10,00
Glicose.....	1,00
Citrato de ferro.....	0,30
Tiosulfato de sódio.....	0,30
Vermelho de fenol	q.s.
Ágar.....	12,00

Segundo instruções do fabricante, 65g do meio de cultura foram reidratados com 1000 ml de água destilada e em seguida levado a fervura para dissolver completamente,

posteriormente foi distribuído em tubos de vidro de 12 X 100 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Deixando o meio solidificar na posição inclinada.

F) Indol – Caldo triptofano (triptofano a 1%) – pH final: 8,0

Composição: Formulação (g/ml)

Peptona ou digerido pancreático de caseína (tripticase).....	2,00 g
Cloreto de sódio.....	0,50 g
Água destilada.....	100,00 ml

Foram misturados todos os itens acima para obtenção do caldo triptofano a 1%, em seguida foram distribuídos aproximadamente 3,0 ml do caldo em tubos de vidro de 12 X 100 mm e autoclavado a 121°C por 20 minutos (KONEMAN et al,1993).

Reativo de Kovac

Composição: Formulação (ml)

Álcool amílico ou isomílico puro.....	150,00
P-Dimetilaminobenzaldeído.....	10,00
Ácido clorídrico concentrado.....	50,00

G) Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar) - DIFCO

Composição: Formulação (g/l) - pH final: 6,8

Sulfato de magnésio.....	0,20
Fosfato de amônio monobásico.....	1,00
Fosfato dipotássico.....	1,00
Citrato de sódio.....	2,00
Cloreto de sódio.....	5,00

Ágar.....	15,00
Azul de bromotimol	0,08

Segundo as instruções do fabricante, 24,2g do meio de cultura foram reidratados em 1000 ml de água destilada e levado a fervura para dissolução completa , em seguida o meio foi distribuído em tubos de vidro de 12 X 100 mm e esterilizado a 121°C por 20 minutos. O meio foi solidificado na posição inclinada.

4.4 Manutenção das Amostras de *E.coli*

Após o isolamento, cada uma das amostras obtidas foi mantida de duas maneiras:

1) Através de repique semanal em placas de Petri ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio de LB (Luria Bertani) e conservadas a 4°C em geladeira.

2) Em freezer a -20°C em tubos de plástico de microcentrifuga contendo glicerol 15% e crescimento bacteriano em LB líquido.

4.5 Testes Utilizados para Pesquisa de Fatores de Virulência em *E.coli*

4.5.1 Produção de Hemolisina

A capacidade hemolítica foi testada semeando-se as amostras com auxílio de uma alça de semeadura em placas de Petri com ágar Müeller-Hinton contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado (gentilmente cedido pelo biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP), onde após incubação a 37°C por 24 horas a produção de hemolisina foi verificada pela presença de um halo de hemólise ao redor das colônias (WATANABE et al, 1988 ; MOBLEY et al, 1990).

Ágar sangue

Composição:

Ágar Müller-Hinton q.s.p.....	100,00ml
Sangue desfibrinado q.s.p.....	5,00 ml

Antes da obtenção do ágar sangue foi preparado a sua base(ágar Müller-Hinton), a qual após autoclavada foi resfriada a uma temperatura aproximada de 40 a 50°C e adicionado assepticamente o sangue desfibrinado com o auxílio de uma pipeta estéril. Foi misturado cuidadosamente o sangue e a base, evitando-se a formação de espuma. O meio foi distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas de 15 X 90 mm, em alíquotas de cerca de 20 ml. Após solidificação as placas com o meio de cultura foram testadas quanto à sua esterilidade sendo colocadas em estufa a 37°C por 24 horas e logo em seguida utilizadas ou estocadas em geladeira a 4°C por até 7 dias.

Ágar Müller-Hinton (Müller-Hinton Agar) - OXOID

Composição: Formulação (g/l)

Infusão desidratada de carne.....	300,00
Hidrolisado de caseína.....	17,50
Amido.....	1,50
Ágar.....	17,00

Segundo instruções do fabricante, 38g do meio de cultura foi dissolvido em 1000 ml de água destilada e levado a ferver para dissolução completa, a seguir o meio foi esterilizado e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após esterilização foi alíquotado 100 ml para ser utilizado como base para o preparo do ágar sangue.

4.5.2 Teste da Hemaglutinação

As amostras foram examinadas quanto a presença de hemaglutininas sensíveis ou resistentes a manose por uma técnica de aglutinação em lâmina (MINSHEW et al, 1978; LATHAM & STAMM, 1984).

Para este teste foram utilizados 2 tipos de hemácias :

- Humana: do tipo sanguíneo 0_A, P₁ positiva (gentilmente cedida pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto-FUNDHERP), coletadas em 3,8% de citrato de sódio, lavadas 3 vezes em PBS (solução tampão fosfato) e ressuspensas em PBS numa concentração de 3%.
- Cobaio: (gentilmente cedida pelo biotério da FMRP), coletadas em solução de EDTA, lavadas em PBS e resuspensas em PBS numa concentração de 1%.

As hemácias foram colocadas em um frasco estéril e conservadas em geladeira a 4°C por um período máximo de 20 dias devido a degradação das hemácias.

As amostras a serem testadas foram previamente semeadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C por 24 horas para posteriormente serem utilizadas no teste de hemaglutinação.

Para realização do teste foi colocado em uma lâmina: 1 gota da hemácia humana a 3% em PBS, 1 gota da suspensão bacteriana previamente crescida em caldo BHI e 1 gota de PBS com 2% de manose. Com auxílio de um palito de madeira estéril as soluções foram misturadas e a seguir a lâmina foi agitada manualmente por aproximadamente 60 segundos. As cepas de *E.coli* que aglutinaram os eritrócitos humanos na presença de manose foram denominadas de manose resistente (HAMR) e são consideradas possuidoras de fímbria P.

Em outra lâmina foi colocada 1 gota da hemácia de cobaio a 1% em PBS, 1 gota da suspensão bacteriana crescida em caldo BHI e 1 gota de PBS com e sem manose a 2%, com o auxílio de um palito de madeira estéril as soluções foram misturadas a seguir a lâmina foi agitada manualmente por aproximadamente 60 segundos. As

amostras de *E.coli* que não aglutinaram os eritrócitos de cobaio na presença de manose foram denominadas de manose sensível (HAMS) e são consideradas possuidoras de fímbria tipo 1.

PBS (Phosphate Buffered Saline) - Solução Tampão

Composição: Formulação (g/l) - pH final: 7,5

NaCl.....	8,00
KCl.....	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,90

Os componentes foram adicionados a 1000 ml de água destilada a seguir a solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos (BIER, 1985).

Caldo Infuso de Cérebro e Coração(Brain Heart Infusion - BHI) - DIFCO

Composição: Formulação (g/l)

Infusão de cérebro bovino	200,00
Infusão de coração bovino.....	250,00
Proteose peptona	10,00
Bacto-dextrose.....	2,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Fosfato dissódico.....	2,50

Segundo as instruções do fabricante, 52g do meio de cultura foram reidratados com 1000 ml de água destilada, e levado a fervura para dissolução completa do meio, a seguir foram distribuídos aproximadamente 3,0 ml em tubos de vidro 12 X 100 mm e

autoclavado a 121°C por 20 minutos. O meio foi testado quanto a sua esterilidade sendo colocado na estufa a 37°C por 24 horas antes da sua utilização.

Manose 2%

Composição:

D-manose.....2,00 g
PBS.....100,00 ml

Após a PBS ser autoclavada, foi retirada uma alíquota de 100,00 ml e misturada com 2,0g de D-manose, após total homogenização a solução foi filtrada para esteriliza-la utilizando-se a membrana Millipori (0,22 µm) e então estocada em frascos de vidro para posterior utilização.

4.5.3 Produção de Colicina

As amostras foram coletadas com auxílio de um palito de madeira estéril a partir de uma cultura recente em meio LB e inoculadas em uma nova placa de LB a qual foi incubada a 37°C por 24 horas. Após este procedimento as placas foram invertidas e expostas aos vapores de clorofórmio por 15 minutos (o clorofórmio foi colocado nas placas com auxílio de uma pipeta automática, aproximadamente 1000 µl em cada placa) promovendo a lise bacteriana. Posteriormente as placas foram mantidas semi abertas por 30 minutos em campo estéril. Em seguida as culturas foram cobertas com uma camada de 4,0 ml de meio LB semi- sólido acrescido de 1,0 ml de uma cultura recente de *E.coli* MA 335 a qual é sensível a colicina (Gentilmente cedida pela Dra. Marilda Carlos Vidotto - Universidade Estadual de Londrina), diluída 10 vezes em meio LB. Após completa solidificação as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A

presença de halos de inibição de crescimento da *E.coli* MA 335 ao redor das colônias indicaram a produção de colicinas pelas amostras que estavam sendo testadas (MINSHEW et al, 1978; VIDOTTO et al, 1990).

LB meio - Luria Bertani (Luria Bertani Medium) - DIFCO

Composição: Formulação (g/l) pH final: 7,0

Triptona.....	10,00
Extrato de levedura.....	5,00
Cloreto de sódio.....	10,00

Os produtos acima foram diluídos em 1000 ml de água destilada, levados a fervura para dissolução completa e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Para utilização em placa foi acrescentado 20,0g de ágar, para utilização em tubo o meio foi distribuído em tubos de vidro de 12 X 100 mm em um volume aproximado de 3,0 ml. O meio foi testado quanto a sua esterilidade sendo colocado na estufa a 37°C por 24 horas (SAMBROOK et al, 1989).

LB semi-sólido

Composição: Formulação (g/l)

Triptona.....	10,00
Extrato de levedura.....	5,00
NaCl.....	5,00
Ágar.....	4,00

Os componentes foram todos diluídos em 1000 ml de água destilada, misturados até completa homogeneização, em seguida foi distribuído em tubos de vidro de 18 X 200 mm um volume de 4,0 ml e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

4.5.4 Produção de Aerobactina

As amostras bacterianas foram previamente semeadas em placas contendo o meio LB e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, com auxílio de um palito de madeira estéril (para evitar a presença de ferro), colônias foram retiradas do meio e transferidas para um tubo de vidro de 12 X 100 mm contendo 3 ml de caldo LB

No caldo LB foi obtido o crescimento das amostras bacterianas através da incubação a 37°C por 24 horas. A seguir foi preparado o meio M9 contendo biperidina, (1,30 ml de M9 e 80 µl de biperidina foram colocados em um tubo de vidro 12 X 100 mm e levados a estufa a 37°C por 30 minutos para ocorrer a quelatação do ferro). Após este prazo esta solução foi misturada a 20 ml de ágar a 2% e distribuída em placa de Petri estéril. Após solidificação do meio foram inoculadas, com auxílio de uma pipeta automática, as amostras que cresceram previamente no caldo LB. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas, esta etapa da prova é chamada de indução. Após ter promovido a indução, foi preparada uma nova placa de M9 com biperidina, usando o mesmo procedimento citado acima, só que no final dos 30 minutos de incubação foi adicionado 0,1 ml da suspensão de *E.coli* indicadora LG 1522 previamente crescida em caldo LB (amostra gentilmente cedida pela Dra. Marilda Carlos Vidotto), e foram acrescentados 20 ml de ágar 2%. Após solidificação da placa foram semeadas as amostras já induzidas (retiradas da placa de indução), com o auxílio de um palito de madeira estéril. Após inoculação a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura do teste o qual foi considerado positivo para aerobactina quando ocorre o crescimento da LG1522 ao redor das amostras inoculadas. Foi utilizado em todas as placas testadas o controle positivo de *E. coli* LG 1315 (gentilmente cedida pela Dra. Marilda Carlos Vidotto) (CARBONETTI & WILLIAMS, 1984; VALVANO et al, 1986).

Bipiridina - 50 mM (Solução estoque)

Diluyente álcool etílico Merck.....100,00 ml
Bipiridina..... 0,78g

Glicose 20% (Solução estoque)

Composição: Formulação (P/V)

Glicose.....20,00 g
Água Milli Q..... 100,00 ml

Após misturar os 2 componentes a solução foi filtrada para esteriliza-la utilizando-se membrana Millipori (0,22 µm).

Glicose 0,2% (Solução uso)

Foi preparada a partir da glicose 20%, onde 1 ml da solução glicose 20% foi misturada a 100 ml de água Milli Q, e posteriormente filtrada para esteriliza-la com membrana Millipori.

Tiamina (Solução estoque)

Composição: Formulação (P/V)

Tiamina.....0,10 g
Água Milli Q.....100,00 ml

Após misturar os 2 componentes acima a solução foi filtrada para esterilização, utilizando-se membrana Millipori.

Tiamina (Solução uso)

Da solução acima preparada foram retirados 5 µl, os quais foram dissolvidos em 20,0 ml de água Milli Q autoclavada.

Triptofano (Solução estoque)

Composição: Formulação (P/V)

Triptofano.....0,10 g
Água Milli Q 10,00 ml

Após misturar os 2 componentes acima a solução foi filtrada para esterilização utilizando-se membrana Millipori.

Triptofano (Solução uso)

Da solução acima preparada foram retiradas 2 µl e dissolvidas em 8,0 ml água Milli Q autoclavada.

Ágar 2%

Composição: Formulação (P/V)

Ágar.....2,00 g
Água Milli Q.....100,00 ml

Dissolver bem os componentes, distribuir 20,0 ml em tubos de vidro 18 X 200 mm e autoclavar a 121°C por 20 minutos.

Meio Mínimo M9 (20 X concentrado)

Composição: Formulação (P/V) pH final: 7,4

Na₂HPO₄.....20,00 g

KH ₂ PO ₄	12,00 g
NaCl.....	2,00 g
NH ₄ Cl.....	4,00 g
Casaminoácido.....	20,00 g
Água Milli Q.(q.s.p.).....	200,00 ml

Após a dissolução dos componentes, o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Posteriormente a autoclavação foram acrescentados ao meio 40,0 ml de glicose 0,2%, 20,0 ml de tiamina e 8,0 ml de triptofano (após acrescentar os aminoácidos no meio M9 a concentração do meio passou de 20 para 15 X concentrado e após a adição do ágar ficou 1 X concentrado).

4.5.5 Determinação de Resistência aos Antimicrobianos.

O método empregado foi da difusão do disco, o qual proporciona a avaliação qualitativa da sensibilidade (BAUER et al, 1966).

As amostras foram cultivadas em 3,0 ml de TSB (caldo tripticase de soja) até atingirem um inóculo padronizado (escala 0,5 de McFarland), correspondente a 10⁹ células/ml.

Com o auxílio de “swabs” estéreis, o inóculo foi semeado em placas contendo ágar Müeller-Hinton (Difco), de modo a obter uma semeadura uniforme.

Os discos de papel de filtro impregnados com quantidades específicas dos diversos antimicrobianos foram aplicados sobre a placa de ágar Müeller-Hinton previamente semeada e colocadas na estufa a 37°C por 24 horas. Após este tempo a leitura foi realizada comparando-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento com parâmetros de interpretação para a leitura desses halos (NCCLS, 2000). As cepas de *E.coli* usadas como controle de qualidade foram ATCC 25922 e ATCC 35218.

Antimicrobianos testados: ácido nalidíxico (NAL, 30 µg), amicacina (AMI, 30 µg), amoxicilina (AMO, 10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (AMO/CLA, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), cefalotina (CFL, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cotrimoxazol (COT, 25 µg), estreptomicina (EST, 10 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), tetraciclina (TET, 30 µg). Os antimicrobianos citados são de procedência de CEFAR Diagnóstica Ltda. e/ou CECON Diagnóstica Ltda.

4.5.6 Preparação do DNA Bacteriano para Amplificação

O DNA a ser amplificado foi liberado do microrganismo por fervura.

A bactéria foi crescida em Luria Broth sem glicose (10 g tripitona + 5 g extrato de levedura + 5g de NaCl por litro, pH 7,0) por 18 horas a 37°C.

A bactéria foi coletada a partir de 1 ml de uma cultura de Luria Broth que cresceu durante a noite. Após centrifugação (12.000 rpm por 30 segundos) o sobrenadante foi desprezado e o precipitado resuspendido em 200 µl de água Milli Q autoclavada. A centrifugação e resuspenção foram novamente realizadas e por último o precipitado é resuspendido em 200 µl de água Milli Q. O tubo foi incubado por 10 minutos a 100°C, para que ocorra a quebra da parede celular. Após a centrifugação do lisado (12.000 rpm por 10 segundos), 150 µl do sobrenadante foi estocado a -20°C como estoque de DNA molde (DNA Template)(KESKIMAKI et al, 2001).

4.5.7 Amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica da PCR

Foram utilizados três jogos de primers de 25 sintetizados pela INVITROGEN, cada um dos jogos foi utilizado para amplificação de um dos três operons fímbriais estudados, *pap*, *afa* e *sfa*. O PCR foi realizado em um volume de 50 µl contendo 10 µl do DNA template; 0,5 µM de cada um dos primers, 200 µM de cada um dos quatro

dioxynucleotideo trifosfato, 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 1,5 M MgCl₂ e 2U de Taq DNA polymerase (AMERSHAM Biosciences). As reações foram recobertas com óleo mineral para evitar evaporação.

A amplificação por PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos seguidos por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento a 65°C por um minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos em um aparelho de PCR (ELMER LETUS). Segundo o protocolo estabelecido por LE BOUGUENEC et al. (1992), após processo de amplificação, dez microlitros da mistura de reação foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 2%, e os produtos da reação foram visualizados após marcação com brometo de etídeo. Um controle da reação (branco) o qual continha todos os componentes da mistura de reação exceto o DNA molde, foi incluído em cada reação de PCR.

Tabela 1: Sequência de bases e tamanho esperado do produto amplificado pelos *primers* de oligonucleotídeos utilizados na PCR.

<i>Primer</i>	Sequências de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho da sequência amplificada
<i>pap 1</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328 pb
<i>pap 2</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328 pb
<i>sfa 1</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410 pb
<i>sfa 2</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410 pb
<i>afa 1</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750 pb
<i>afa 2</i>	CATCAAGCTGTTTGTTTCGTCCGCCG	750 pb

5. Resultados

Neste estudo foram avaliadas cepas de *E.coli* isoladas de vários estabelecimentos como: açougues, supermercados e mercearias do município de Taquaritinga – SP, para pesquisa de fatores de virulência, os quais caracterizam ExPEC. Foram coletadas 69 amostras oriundas de carne moída e de *swabs* das mãos dos manipuladores e moedores de carne. Obteve-se 287 cepas de *E.coli*, as quais 5 delas foram caracterizadas como ExPEC (3 de carne moída e 2 do moedor de carne).

Através da inspeção visual os maquinários, aparentemente, apresentavam-se limpos, porém pelos resultados obtidos (Tabela 2), pode-se verificar que a higienização dos mesmos era realizada de maneira incorreta e insuficiente para eliminar os microrganismos patogênicos.

Tabela 2. Distribuição dos fatores de virulência de cinco cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Amostras/fonte	Aerobactina	Colicina	Hemaglutinação	Hemolisina
647/carne	+	+	Fímbria P Fímbria Tipo 1	+
685/carne	+	0	Fímbria Tipo 1	+
738/moedor	+	+	Fímbria P Fímbria Tipo 1	0
822/moedor	+	+	Fímbria P Fímbria Tipo 1	+
919/carne	+	0	Fímbria Tipo 1	+

+: teste positivo; 0; teste negativo

De acordo com a distribuição dos fatores de virulência pesquisados, pode-se observar que existe na maioria das cepas de ExPEC a presença de pelo menos 3 fatores de virulência que é uma das principais características dessa classe de *E.coli*.

Ao analisar a tabela abaixo, observa-se a grande freqüência de aerobactina (100%) e hemolisina (80%), fatores de virulência importantes para a bactéria adquirir ferro.

Tabela 3. Análise da expressão dos fatores de virulência de cinco cepas de ExPEC obtidas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Fatores de virulência	Número de cepas	Porcentagem
Hemolisina	4	80%
Colicina	3	60%
Aerobactina	5	100%
Fímbria P	3	60%
Fímbria Tipo 1	5	100%

Ao analisar a Tabela abaixo, observa-se que todas as cinco cepas de ExPEC testadas apresentaram fímbrias, seja fímbria P na qual temos a aglutinação de eritrócitos humanos na presença de manose e por isso são denominadas MR (manose resistente) e/ou cepas que não aglutinam eritrócito de cobaio (porquinho da Índia) na presença de manose, as quais são denominadas de MS (manose sensível) e são consideradas possuidoras de fímbria tipo 1.

Tabela 4. Tipos de hemaglutinação das cinco cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Grupo	Aglutinação de Eritrócito		Nº de cepas
	Humano	Cobaio	
I	MR	MS	3
II	MR	MR	0
III	MS	MS	2

Grupo I: cepas que causam ambas, HAMR em eritrócito humano e HAMS em cobaio; Grupo II: cepas que causam HAMR em ambos, eritrócito humano e em cobaio; Grupo III: cepas que causam HAMS em ambos, eritrócito humano e cobaio. HAMR: hemaglutinação manose resistente; HAMS: hemaglutinação manose sensível

Na Tabela 5 foi verificada a presença do gene de virulência *pap* isolada em 3 cepas de ExPEC, sendo que 2 dessas cepas (66%) apresentavam fímbria do tipo 1 associada com a fímbria P (associação que permite a bactéria uma aderência mais forte a superfície do epitélio do hospedeiro), enquanto que na associação dos genes *pap-sfa* foi observada uma distribuição igual entre cepas que apresentavam apenas fímbria do tipo 1 e que apresentavam fímbria P mais fímbria do tipo 1, nenhuma das cepas analisadas foi detectada apenas a presença da fímbria P. O gene *afa* não foi evidenciado em nenhuma das cepas analisadas

Tabela 5. Correlação da presença de genes de virulência e a presença de fímbria em cinco cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Genes de virulência (nº amostras)	Fímbria P% (nºamostras)	Fímbria tipo 1% (nºamostras)	Fímbria P + Fímbria tipo1 (nºamostras)
<i>pap</i> (3)	0	33%(1)	66%(2)
<i>pap-sfa</i> (2)	0	50%(1)	50%(1)

Ao analisar a distribuição do perfil de resistência das cinco cepas de ExPEC (Tabela 6), foi observada uma grande porcentagem de resistência a estreptomicina e tetraciclina (80%) e também ampicilina e cefalotina (60%). Os antimicrobianos que apresentaram melhor resposta foram: amoxicilina-ácido clavulânico e ceftriaxona, com os quais se obtiveram 100% de sensibilidade, demonstrando que são drogas bem empregadas. A amicacina, amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina apresentaram uma porcentagem de resistência de 20%.

Tabela 6. Perfil de resistência e sensibilidade de isolados de ExPEC obtidos de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Cepas	Antimicrobianos											
	NAL	AMI	AMO	AMO- CLAV	AMP	CFL	CRO	CIP	COT	EST	GEN	TET
647	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
685	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
738	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R
822	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R
919	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R
R%	40	20	20	0	60	60	0	20	40	80	20	80

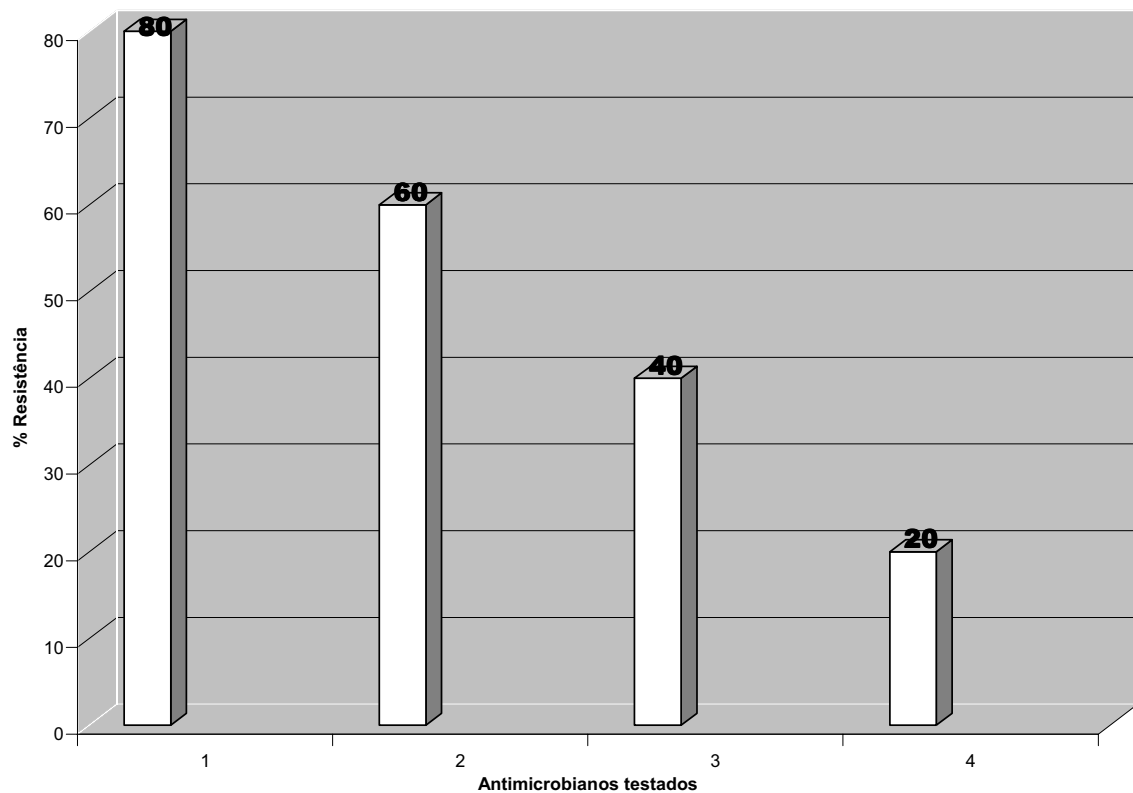
NAL: Ácido Nalidixico; AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMO-CLAV: Amoxicilina+Ácido clavulânico; AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CRO: Ceftriaxona; CIP: Ciprofloxacina; COT: Cotrimoxazol; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; R: Resistência; S: Sensível; R%: Porcentagem de resistência.

A distribuição das adesinas (Tabela 7) mostrou uma maior frequência do gene *pap* (60%), já a presença do gene *sfa* só foi demonstrada concomitantemente com a adesina *pap* obtendo-se um percentual de 40%. Em nenhuma das 5 cepas de ExPEC houve a presença do gene *afa*.

Tabela 7. Distribuição dos genes de virulência das adesinas *pap*, *sfa* e *afa* em 5 cepas de ExPEC isoladas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Determinantes	Nº de cepas	Porcentagem
<i>pap</i>	3	60%
<i>sfa</i>	0	0
<i>afa</i>	0	0
<i>pap-sfa</i>	2	40%

pap: pili associado a pielonefrite; *sfa*: adesina S fimbria; *afa*: adesina afimbrial



1:Tetraciclina – Estreptomicina (80%); 2: Ampicilina – Cefalotina (60%); 3:Cotrimoxazol – Ácido Nalidíxico (40%); 4: Amicacina, Amoxicilina, Ciprofloxacina, Gentamicina (20%).

Figura 2. Distribuição do perfil de resistência de 5 cepas de ExPEC obtidas de açougues do município de Taquaritinga – SP de março de 2004 a janeiro de 2005.

Pode-se observar na Figura 2 que temos alguns antimicrobianos que possuem um mesmo perfil de resistência como: Tetraciclina e Estreptomicina (80%); Ampicilina e Cefalotina (60%). Isso talvez, seja devido a semelhança no modo de ação do antimicrobiano, no caso da Tetraciclina e Estreptomicina agem de uma mesma forma, inibindo a síntese protéica, já a Ampicilina e Cefalotina ambas age inibindo a síntese de parede celular.

Nas figuras 3, 4 e 5 podemos observar a pesquisa dos genes *pap*, *afa* e *sfa* através da eletroforese dos produtos de amplificação do DNA template das amostras de *E.coli* pesquisadas, através da técnica de PCR

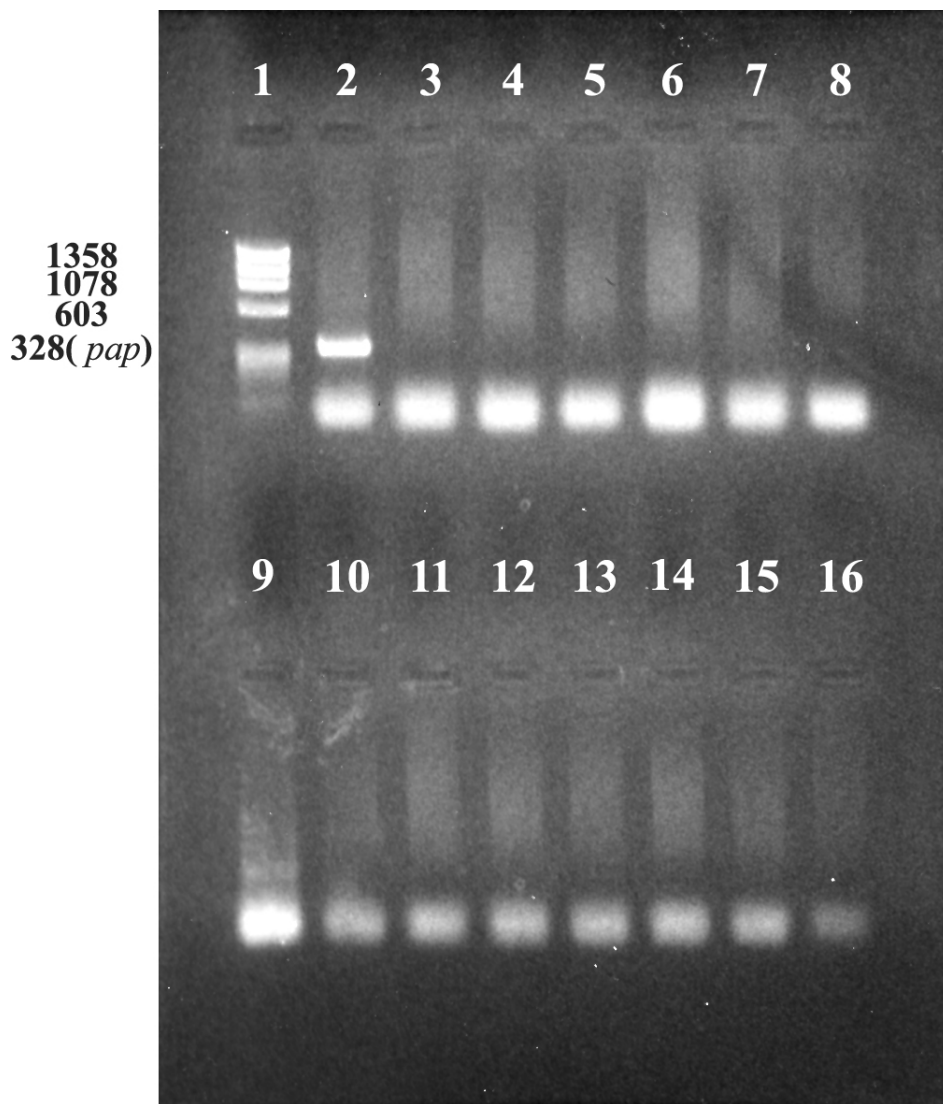


Figura 3: Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular Φ X174 DNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo *pap*+; Canaleta 3: cepa 142; Canaleta 4: cepa 267; Canaleta 5: cepa 268; Canaleta 6: cepa 269; Canaleta 7: cepa 270; Canaleta 8: cepa 271; Canaleta 9: cepa 275; Canaleta 10: cepa 276; Canaleta 11: cepa 277; Canaleta 12: cepa 278; Canaleta 13: cepa 279; Canaleta 14: cepa 280; Canaleta 15: cepa 380; Canaleta 16: cepa 381.

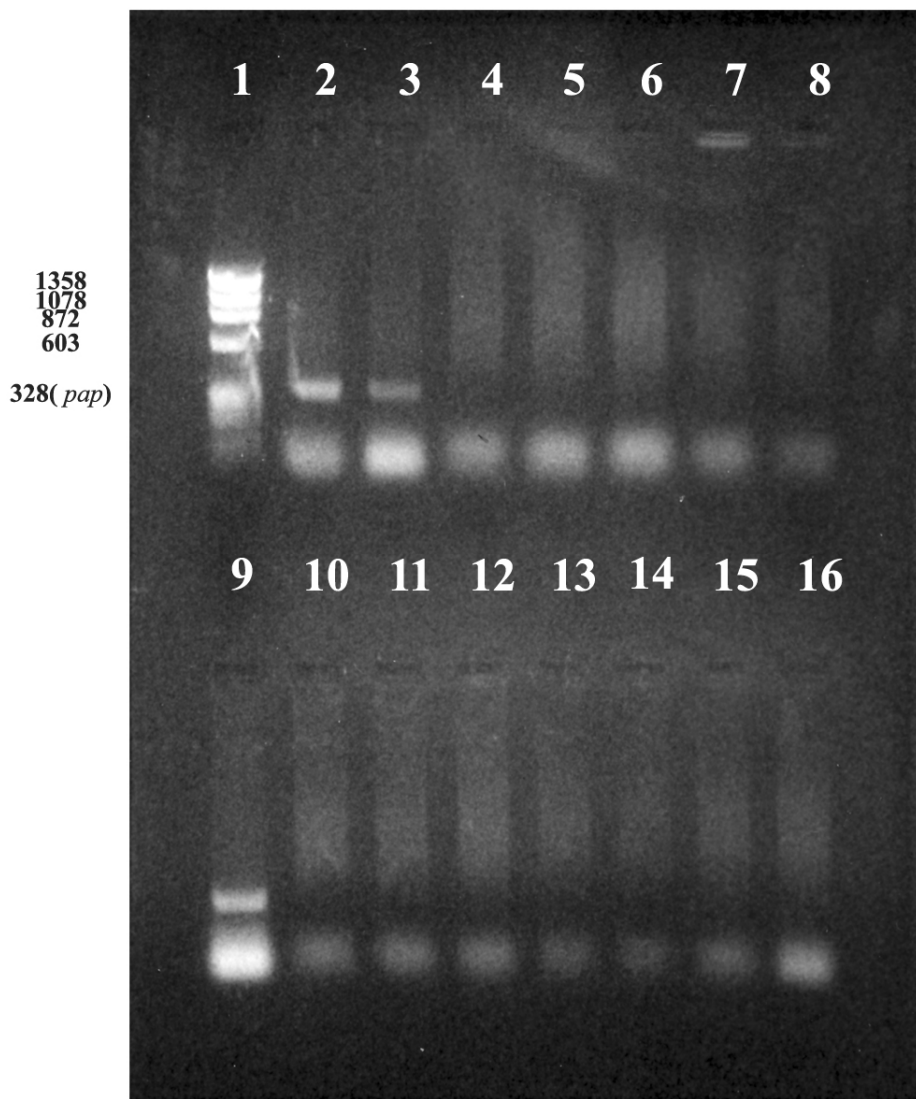


Figura 4: Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular Φ X174 DNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo *pap*+; Canaleta 3: cepa 647 (*pap*+); Canaleta 4: cepa 648; Canaleta 5: cepa 649; Canaleta 6: cepa 652; Canaleta 7: cepa 653; Canaleta 8: cepa 654; Canaleta 9: controle positivo *pap* +; Canaleta 10: cepa 655; Canaleta 11: cepa 656; Canaleta 12: cepa 670; Canaleta 13: cepa 671; Canaleta 14: cepa 694; Canaleta 15: cepa 695; Canaleta 16: cepa 696.

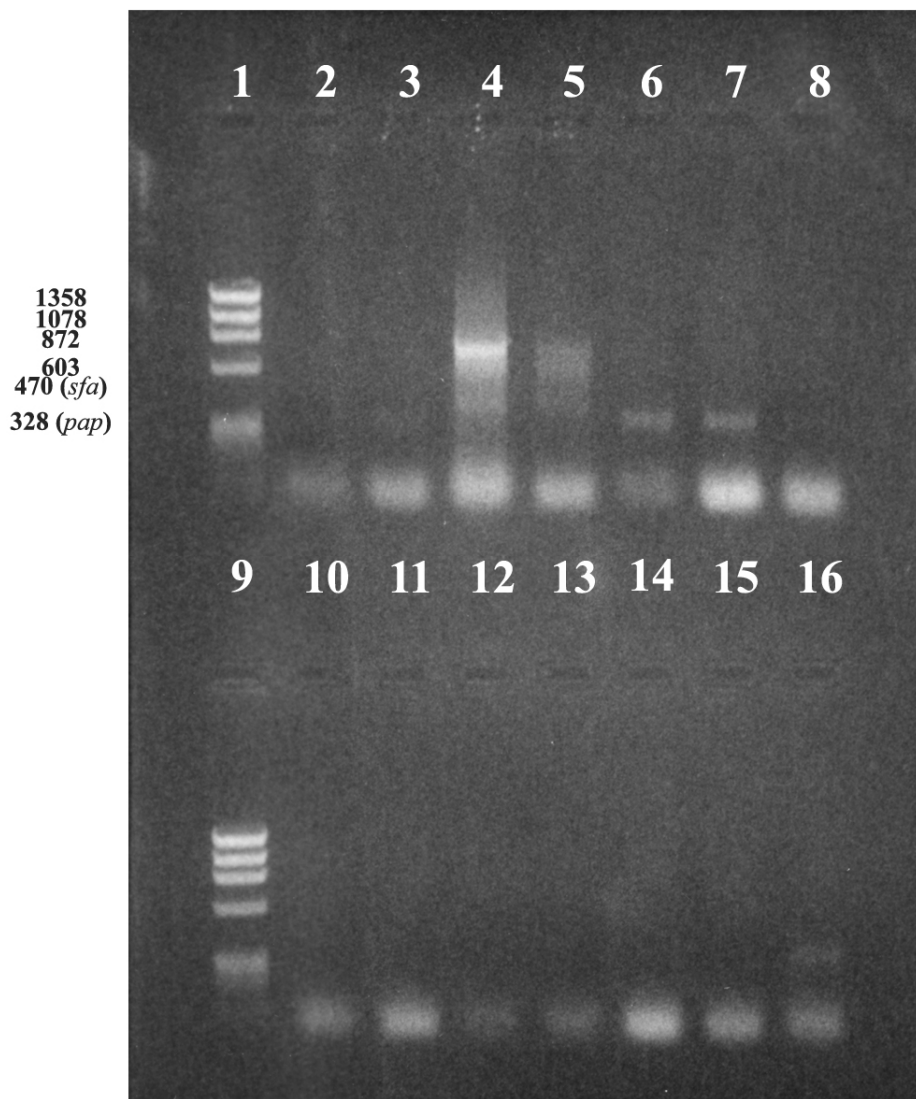


Figura 5: Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular Φ X174 DNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: branco da reação; Canaleta 3: cepa 740; Canaleta 4: cepa 738 (*pap*+/*sfa*+); Canaleta 5: cepa 919 (*pap*+/*sfa*+); Canaleta 6: cepa 647 (*pap*+); Canaleta 7: controle positivo *pap*+; Canaleta 8: cepa 631; Canaleta 9: marcador de peso molecular Φ X174 DNA; Canaleta 10: branco da reação; Canaleta 11: cepa 817; Canaleta 12: cepa 818; Canaleta 13: cepa 820; Canaleta 14: cepa 824; Canaleta 15: cepa 823; Canaleta 16: cepa 822 (*pap*+).

6. Discussão

O presente estudo foi realizado em 23 estabelecimentos comerciais como: açougues, supermercados e mercearias do município de Taquaritinga, estado de São Paulo, durante um período de 10 meses e permitiu o isolamento de duzentos e oitenta e sete cepas de *E.coli* de amostras de carne moída, *swabs* de moedor de carne e mãos de manipuladores de carne. Cinco destas cepas foram caracterizadas como *E.coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) (Tabela 2).

As ExPEC são responsáveis pela maioria das infecções extra-intestinais produzidas por *E.coli* em indivíduos não comprometidos, como: infecção do trato urinário (ITU), bacteremias e meningite neonatal. Se diferem das *E.coli* comensais e intestinais por apresentarem (no mínimo 2) fatores de virulência que irão permitir que essas cepas colonizem a superfície das mucosas do hospedeiro, subverta os mecanismos de defesa e assim adquira nutrientes essenciais, como o ferro para desenvolver a infecção (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

A infecção bacteriana se inicia quando o microrganismo supera os múltiplos mecanismos de defesa natural do hospedeiro. O patógeno deve sobreviver no meio ambiente do hospedeiro, aderir e multiplicar, resistindo aos mecanismos de defesa. Pode-se dizer que o curso e desenvolvimento da infecção depende da defesa imunológica e não imunológica do hospedeiro e são essas condições, que irão determinar se a bactéria conseguirá colonizar a mucosa levando a infecção. Para ultrapassar estas barreiras a bactéria pode utilizar diferentes fatores de virulência para auxiliar o início da infecção (FÜNFSTÜCK et al, 1989).

A hemolisina produzida por cepas de *E.coli* tem atraído muita atenção e gerado várias pesquisas por representar um significativo fator patogênico(CAVALIERI et al, 1985; FELMLEE et al, 1985). A capacidade de produção de hemolisina é um determinante de virulência que promove a colonização da mucosa prejudicando o hospedeiro(O'HANLEY et al, 1985), e assim pode-se dizer que a virulência de cepas de *E.coli* patogênica compreende a capacidade de aderência, multiplicação e interferência

com o sistema de defesa do hospedeiro (HACKER et al, 1983; VÄISENEN-RHEN et al,1984).

Após a bactéria conseguir vencer as defesas do hospedeiro teremos a expressão da virulência de cepas de *E.coli* que até então eram consideradas avirulentas (WAALWIJK et al, 1983). No caso das ExPEC estas constituem 20% das *E.coli* intestinais, estabelecem prolongadas colonizações assintomáticas no trato intestinal do hospedeiro, agem como efetivas colonizadoras intestinais, mais do que as comensais, porém sob circunstâncias ainda não esclarecidas, saem do trato gastrointestinal e migram para um sítio estéril, tornando-se uma ameaça ao hospedeiro (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

Em geral as cepas de *E.coli* hemolíticas podem ser isoladas de diversas fontes. Em humanos a flora fecal normal contém aproximadamente 12% de cepas hemolisinas positiva comparada com 35 a 50% de *E.coli* causando infecções extra-intestinais como: bacteremia, septicemia e ITU (SCHEFFER et al, 1985), o que demonstra que a produção de hemolisina é extremamente comum entre as cepas de *E.coli* causando infecções extra-intestinais (MINSHEW et al, 1978; HUGHES et al, 1983).

BONACORSI et al (2006), analisaram 83 crianças do sexo masculino com ITU em um período de 90 dias apresentando ou não bacteremia e observou que a ausência de hemolisina e antígeno K1 é prognóstico negativo para bacteremia. O antígeno capsular K1 está envolvido na sobrevivência da *E.coli* no sangue e é o maior determinante de soro resistência e a hemolisina está envolvida na virulência extra-intestinal de *E.coli* e deve prejudicar células epiteliais do rim humano, facilitando a passagem da bactéria na barreira epitelial, portanto ambos determinantes devem ter um papel na bacteremia.

Essas cepas estão frequentemente associadas com outros fatores como: hemaglutinação manose resistente (HAMR) induzindo à aderência da bactéria a célula epitelial (HACKER et al, 1983; SCHEFFER et al, 1985). A combinação desses fatores representa um pré-requisito para iniciação da infecção (FÜNFSTÜCK et al, 1989), bem como para caracterização de uma ExPEC (JOHNSON & RUSSO, 2002 a).

A atividade hemolítica foi significativamente freqüente nas amostras analisadas (80%), assim como a produção de aerobactina (100%) e presença de fímbria P (60%) e produção de colicina (60%) (Tabela 3).

Desta maneira tomando por base os dados pode-se afirmar que as cepas que possuem esses fatores de virulência relacionados como: a habilidade de aderir a células epiteliais (cepas HAMR positivas), prejudicar as células do tecido (cepas hemolisina positiva), sobreviver no tecido (em geral cepas aerobactina positiva), são cepas que possuem uma grande possibilidade de manter a infecção cronicamente, sem uma característica clínica marcante, que é o que ocorre nas bacteriúrias assintomáticas (FÜNFSTÜCK et al, 1989). As infecções causadas por ExPEC não ocorrem de forma epidêmica, como as causadas por *E.coli* O157:H7, são em geral discretas, aparentemente não são provenientes de alimentos contaminados e em muitas vezes, causam somente uma pequena morbidade (Ex: cistite) ou um leve comprometimento do hospedeiro (início de pneumonia) (RUSSO & JOHNSON, 2000).

As cepas de *E.coli* que expressam tipicamente a fímbria P, estrutura que confere um fenótipo de aderência possuem uma forte aderência ao epitélio, mais do que as cepas que possuem apenas a fímbria do tipo 1 (HAGBERG et al, 1981). No presente estudo pode-se observar que a maioria das cepas (60%) possuem a associação da Fímbria P e da fímbria do tipo 1 potencializando a aderência ao epitélio (Tabela 2 e Tabela 5).

A presença concomitante de hemolisina e adesinas nas amostras testadas sugere que estas amostras possuem vantagens seletivas para o crescimento e sobrevivência na mucosa do hospedeiro (Tabela 2).

A aderência a células uroepiteliais humanas tem sido amplamente pesquisada ao longo de vários anos. VAN DEN BOSCH et al. (1980) analisaram 23 cepas de *E.coli* e as dividiram em 3 grupos com diferentes níveis de virulência para investigação dos mecanismos de aderência e observaram que o grupo mais virulento aderiu melhor às células uroepiteliais do que as cepas avirulentas, assim concluíram que a aderência devia ser um importante fator de virulência.

O'HANLEY et al. (1985) mostraram associação significativa entre produção de hemolisina e presença de adesina manose resistente (HAMR), em seu estudo

observaram que cepas de *E.coli* pielonefritogênicas agrupam-se em poucos sorotipos O, elaboram alfa-hemolisina e exibem HAMR. Neste estudo essa íntima relação entre cepas HAMR e hemolíticas pode ser verificada sendo que das 3 amostras HAMR (60%) apenas 1 não está associada a produção de hemolisina (Tabela 2).

Embora pareça existir alguma correlação entre a adesão e a produção de hemolisina estes são fenômenos que ocorrem independentemente um do outro. Essa correlação só irá existir se os dois fatores forem controlados pelo mesmo plasmídeo (GREEN & THOMAS, 1981).

LOW et al. (1984) demonstraram que os genes que codificam hemolisina e HAMR são estreitamente ligados principalmente em amostras de *E.coli* isoladas do trato urinário do sorogrupo O6, bem como de cepas J96 do sorogrupo O4. Sendo assim, provavelmente a produção de hemolisina e a hemaglutinação devem ser determinados por plasmídios relacionados.

Essa ligação entre os genes que codificam hemolisina e a hemaglutinação em alguns isolados de *E.coli* é importante para determinar se outros fatores de virulência associados estão presentes na mesma região do DNA. Estes fatores devem ter um papel na colonização e manutenção no crescimento do patógeno no epitélio (LOW et al, 1984).

Se for possível entender as bases genéticas e a expressão natural de alguns fatores de virulência associados em *E.coli*, será possível compreender a patogenia da infecção extra-intestinal causada por este patógeno e o processo da doença (MINSHEW et al, 1978).

Resultados revelaram que a *E.coli* uropatogênica que hemaglutina o tipo "O" humano é mais freqüente que outros patógenos isolados da urina, além disso, é o mais eficiente hemaglutinador que adere a superfície da membrana quando comparado com outras enterobacteriaceae (GREEN & THOMAS, 1981).

LATHAM & STAMM (1984) ao pesquisarem pacientes com ITU sem comprometimento imunológico observaram que a maioria das cepas (77%) possuíam fímbrias do tipo 1 ou fímbria P, e o presente estudo pode-se observar resultados similares, pois das cepas de ExPEC encontradas todas possuem fímbria do tipo 1 e 3 (60%) possuem fímbria P (Tabela 3), demonstrando que este é um fator de virulência

importante para iniciar a infecção e deve estar presente principalmente em hospedeiros sem comprometimento imunológico.

A colicina V, é um de vários fatores que podem contribuir para a virulência de cepas de *E.coli* causando infecções extra-intestinais em humanos (DAVIES et al, 1981). Esta proteína está presente, mais frequentemente, em isolados extra-intestinais do que em isolados de fezes de pessoas saudáveis. Já foi verificado que a presença de colicina V é um importante indicador da presença de plasmídios de virulência, mas sua atividade, por si, não é essencial para o aumento de virulência em *E.coli* (PERUGINI & VIDOTTO, 1992).

MINSHEW et al. (1978) demonstraram que *E.coli* virulenta possuía várias propriedades genéticas especiais que incluía a produção de hemolisina, a biossíntese de colicina V e aderência específica. Eles analisaram 59 amostras provenientes da urina, nos quais 49% eram hemolisina positiva e apenas 7% colicina V positiva. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com a literatura que indica que a colicina V em *E.coli* é encontrada em menor proporção, porém isto é significativo em isolados de infecção humana, uma vez que das 5 amostras de ExPEC 3 apresentaram colicina positiva (Tabela 2).

DAVIES et al. (1981) analisaram a presença de colicina V em isolados fecais, sangue e urina provenientes de pacientes com septicemia e observaram que a porcentagem em isolados fecais (13,6%) é significativamente menor comparado com sangue (31,6%) e urina (26,2%), demonstrando que esse fator de virulência está mais associado a bactérias relacionadas a infecções extra-intestinais.

A incidência de colicina V positiva isolada de *E.coli* em bacteremias humanas é consideravelmente baixas quando comparada com septicemia em animais. Isso deve ser reflexo da baixa razão de carreamento de colicina V de *E.coli* na flora fecal humana ou a instabilidade da colicina V no plasmídio humano, havendo uma maior contribuição da colicina V em infecções de animais (MINSHEW et al, 1978).

A aquisição e assimilação de ferro por cepas invasivas de *E.coli* é muito importante para a sobrevivência e disseminação dos isolados extra-intestinais humanos (OPAL et al, 1990). Existem numerosos estudos que indicam que a infecção deve ser realçada na presença de ferro, e existem vários mecanismos nos quais o ferro deve

influenciar na interação parasita-hospedeiro promovendo assim o crescimento bacteriano que pode ser observado tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. MONTGOMERIE et al. (1984), através de experimentos com ratos observaram que as amostras de *E.coli* que eram aerobactina positiva levavam os ratos a ter mais infecção renal, e a proporção de morte era maior do que nas cepas aerobactina negativa. Observaram também que havia uma forte correlação de aerobactina com o crescimento de amostras de *E.coli* na urina.

Posteriormente foi verificado que a produção de aerobactina é detectada em grande freqüência na urina e em isolados de sangue, em maior quantidade do que em isolados fecais de indivíduos saudáveis, comprovando o importante papel desse fator de virulência em isolados de *E.coli* extra-intestinal (OPAL et al, 1990).

VALVANO et al. (1986) analisaram cepas de *E.coli* isoladas de vários sítios de infecção, inclusive neonatal e observaram que a maioria das cepas analisadas (92,5%) possuíam o sistema aerobactina ou a habilidade de produzir hemolisina ou ambas, sugerindo que essas 2 propriedades conferiam resistência a fagocitose e a atividade bactericida do soro do hospedeiro, contribuindo para a virulência da bactéria.

Segundo OPAL et al. (1990) a aerobactina deve ser o principal mecanismo de aquisição de ferro em isolados de *E.coli* extra-intestinal, e a hemolisina deve servir como um mecanismo alternativo na ausência de genes da aerobactina. Esta afirmativa não pode ser completamente comprovada neste estudo, uma vez que 80% das amostras de ExPEC produziram hemolisina (Tabela 3).

JOHNSON et al. (1988) estudaram a aerobactina e observaram que ela estava fortemente associada a microrganismos com resistência múltipla a antimicrobianos, sendo assim a presença de fatores de virulência apresentaram as seguintes porcentagens aerobactina (43%), hemolisina (43%), fímbria P (74%) e fímbria tipo 1 (98%), resultado divergente ao deste estudo em relação a aerobactina (100%), hemolisina (80%), porém aproxima-se de fímbria P (60%) e fímbria do tipo 1(100%) (Tabela 3).

Vários estudos têm sugerido que o alimento deve ser uma fonte para o homem adquirir *E.coli* resistente a antimicrobianos e/ou ExPEC, como também para outros

patógenos como: *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *E.coli* O157:H7 (JOHNSON et al, 2005).

Bactérias provenientes da carne bovina e aves podem contaminar cozinhas durante o preparo das refeições, e a bactéria resistente a antimicrobianos serve como fonte de genes de resistência, as quais podem ser transferidas para a flora intestinal humana (WINOKUR et al, 2001).

O uso de agentes antimicrobianos na terapêutica em humanos e na medicina veterinária, bem como na ração animal como profilaxia para promover o crescimento dos animais, ultimamente tem inserido uma pressão seletiva favorável para a propagação da resistência bacteriana (SCHROEDER et al, 2003). Bactérias resistentes presentes em intestinos de animais podem contaminar a carne durante os estágios do processo de abate e subsequentemente manuseando o tecido animal (JACKSON et al, 2001).

Quando ocorre a ingestão de alimento contendo bactérias, estudos revelam que pode haver uma transferência horizontal de genes de virulência entre a bactéria ingerida e as comensais da flora intestinal, isso demonstra uma extensiva transferência de gene de resistência a antimicrobianos entre as bactérias (SHOEMAKER et al, 2001; GORBACH, 2001). Isso é o que ocorre com as ExPEC que estão presentes nos alimentos como a carne, onde após ser ingerida alojam-se no intestino de indivíduos saudáveis (constitui 20% das *E.coli* ali existentes) e começam a trocar informações genéticas através da transferência horizontal com *E.coli* comensais (JOHNSON et al, 2005).

JOHNSON et al. (2003), pesquisaram 169 amostras de frango em um período de 1999 a 2000 e isolaram 110 *E.coli*, das quais 23 foram caracterizadas como ExPEC, sendo 13 resistente ao Ac. Nalidíxico, demonstrando que a carne de frango é uma potencial fonte de ExPEC.

SCHROEDER et al. (2003) observaram que 209 isolados de *E.coli* em carne moída eram resistentes à estreptomicina e destas 186 (89%) eram também resistente a tetraciclina, resultado que se assemelha ao do presente estudo no qual 80% das cepas que são resistentes a estreptomicina mostram-se resistente a tetraciclina também

(Figura 2). Pesquisas devem ser feitas para examinar as base genéticas desse fenótipo de co-resistência.

No Brasil, apesar da legislação brasileira proibir a utilização de antimicrobianos em animais produtores de alimentos, tal prática é comum, o que favorece a presença de resíduos de antimicrobianos nestes alimentos e conseqüentemente a seleção de bactérias resistentes. MARTINS et al. (2004) ao pesquisarem produtos cárneos (lingüiça, hambúrguer, salsicha) no estado do Ceará, isolaram 124 cepas de *E.coli* onde 63% possuía múltipla resistência entre 5 a 7 antimicrobianos. No presente estudo podemos observar essa múltipla resistência, de 12 antimicrobianos testados 80% das amostras apresentaram resistência a um número maior ou igual a 3. A observação que a grande maioria dos isolados possuem resistência a 1 ou mais antimicrobianos amplamente utilizados na população, prova a evidência que a carne deve ser um importante reservatório de *E.coli* resistente a antimicrobianos e das ExPEC merecendo atenção especial dos órgãos de saúde pública.

SCHROEDER et al. (2003) ao analisarem *E.coli* em 200 amostras de carne moída (bovina, frango e peru) obtiveram resultados de resistência a antimicrobianos menores que do presente estudo, para cefalotina (38%) e ampicilina (35%), enquanto que o presente estudo foi praticamente o dobro 60% para ambos os antimicrobianos. No caso da ciprofloxacina todas as amostras foram sensíveis e no presente estudo 20% resistente, padrão de resistência alto por ser um antimicrobiano de alto custo, em contra partida ao analisar a ceftriaxona obteve-se melhor resultado, todas as amostras sensíveis e no trabalho citado 1% de resistência, demonstrando que é um antimicrobiano que deve estar sendo bem empregado (Tabela 6).

Quando se observam diferenças de resistência de um país para outro , isso se deve a vários fatores como: possível diferença na administração da droga (oral ou injetável), controle do uso indiscriminado da droga, bem como a extensão de tempo que o antimicrobiano tem sido utilizado no país pela medicina veterinária (SCHROEDER et al, 2003).

É difícil avaliar completamente o impacto global da resistência aos antimicrobianos porque os dados similares e consistentes para os mesmos microrganismos e para as diferentes drogas não estão sempre uniformemente

disponíveis. O antimicrobiano não inibe todas as bactérias do mesmo modo ou com igual potencial, motivo pelo qual a terapia antimicrobiana varia consideravelmente, sendo que “*in vitro*”, a resistência a drogas não necessariamente se refleti da mesma maneira “*in vivo*”, assim pode-se ter a falha terapêutica em microrganismos sensíveis (RAZ et al, 2002).

AHMED et al. (2000) analisaram 1500 amostras de urina no Sudão e demonstraram que a *E.coli* possui um perfil de resistência elevado para ampicilina (94%) e tetraciclina (85%), resultado semelhante a este estudo para tetraciclina (80%), já para ampicilina a porcentagem de resistência desse estudo foi menor (60%) (Figura 2). Porém os resultados não foram satisfatórios para o Sudão, nem para o Brasil (neste estudo), já que o perfil de resistência está muito elevado para essas drogas (Tabela 6).

O aumento no nível de resistência também foi detectado nos países europeus especialmente para amoxicilina. Na Inglaterra durante um período de 21 anos (1971 a 1992) o nível de resistência para isolados de *E.coli* provenientes de ITU aumentou de 11,8% para 43,3% para amoxicilina (GRUNEBERG, 1994). Na Holanda esse nível aumentou de 24,7% em 1982 para 34% em 1992 para mesma droga (BEUNDERS, 1994). Isso demonstra que mesmo em países desenvolvidos, se não for aplicada uma política racional no uso das drogas antimicrobianas o aumento do nível de resistência, com o passar do tempo é inevitável.

GARAU et al. (1999) em estudo avaliaram a resistência a quinolona em *E.coli* de 1992 a 1997, em Barcelona (Espanha) e observaram um aumento das *E.coli* quinolonas resistentes (QREC) de 9% em 1992 para 17% em 1996, avaliaram pacientes com bacteremia e indivíduos saudáveis. Houve uma alta prevalência de QREC em fezes de indivíduos saudáveis e de crianças que nunca tinham recebido quinolona, indicando que membros da comunidade serviam como reservatório de QREC, que provavelmente deveriam ser provenientes do meio ambiente (considerando que em aves locais já tinham sido documentadas em estudo anterior a presença de QREC). Esse estudo reforça a necessidade de um controle prudente no uso de antimicrobianos, tanto nos humanos, mas também na medicina veterinária.

VELASCOS et al. (2001) compararam em seus estudos as amostras de *E.coli* quinolonas resistentes (QREC) e as amostras de *E.coli* quinolonas sensíveis (QSEC), e

observaram que as QREC deveriam ter uma capacidade de invasão menor que as QSEC. Ao analisar casos de pielonefrite, abscessos renais e bacteremias encontraram uma baixa proporção de QREC. Alguns estudos mostraram que a exposição a esse antimicrobiano resulta em produção reduzida de certos fatores, que contribuem para a redução da virulência bacteriana.

SMITH et al. (1966 in SMITH, 1969) observaram que as bactérias da família enterobacteriaceae devem carregar genes que conferem resistência a várias drogas antibacterianas, os fatores R, os quais podem se transferidos de uma bactéria para outra por conjugação. Ao analisarem bactérias isoladas de 100 amostras de pacientes com ITU quanto à presença de plasmídeo R, observaram que de todas as espécies isoladas, 69% das amostras foram: resistentes a 1 ou mais drogas testadas, transferiam parte ou todo o seu gene de resistência para a *E.coli* sensível misturada na cultura, e que a eficiência para transferir a resistência depende da espécie e da cepa em questão.

O motivo da diferença da freqüência de resistência a várias drogas e a prevalência de fatores R pode ter como causa o gradiente de concentração das drogas nos vários órgãos e tecidos durante a terapia. Na verdade, a maioria das drogas é excretada pela urina ou pela bile, atingindo concentrações urinárias, enquanto que no intestino a concentração é usualmente menor. Concentrações menores selecionam um maior número de cepas resistentes, enquanto que a “sobrevivência” de fatores R é muito limitada, quando se utiliza altas concentrações da droga. Dessa maneira a seleção de cepas resistentes à droga é menor, porém a pressão seletiva favorece a transferência de resistência entre as cepas através dos plasmídios (conjugação) (GUARDA et al, 1976).

A relação entre aerobactina e plasmídeo de resistência a antimicrobianos tem sido descrita na literatura. Este plasmídeo deve servir, no futuro, como carregador ideal para a disseminação dessas características de resistência, pois se a afirmativa que amostras que produzem aerobactina são mais patogênicas e mais frequentemente tratadas com antimicrobianos, esse fato proporciona a relação positiva para a relação de resistência a antimicrobianos e a produção de aerobactina (MARTINEZ et al, 1987).

Existem certos clones e *E.coli* extra-intestinal que possuem determinantes cromossômicos para hemolisina, aerobactina e adesinas de superfície para desencadeamento de infecções humanas invasivas, mas não necessariamente possuem seleção para antimicrobianos. Essas amostras então, podem ser aerobactina e hemolisina positiva e serem cepas sensíveis frente aos antimicrobianos, isso pode ser observado no presente estudo (Tabela 2 / cepa 647), o contrário também pode ocorrer, as amostras serem aerobactina e hemolisina negativa e apresentar resistência frente aos antimicrobianos (OPAL et al, 1990).

A habilidade de aderência à superfície do uroepitélio tem sido demonstrada ser um pré-requisito para que cepas de *E.coli* colonizem o epitélio e posteriormente provoquem a infecção. Existem fatores de virulência que estão envolvidos nesta colonização e desenvolvimento da infecção que são: *pap* (pili associada a pielonefrite), *sfa* (fimbria S) e *afa* (adesina afimbrial) (LE BOUGUENEC et al, 1992). Estes fatores podem ser detectados pelo método de PCR (Polymerase Chain Reaction), que é um método muito utilizado por permitir a obtenção de dados com grande rapidez (YAMAMOTO et al, 1995). (Figuras 3,4 e 5).

DAIGLE et al. (1994) ao analisarem isolados de *E.coli* de pielonefrite encontraram uma alta incidência de *pap* positivo (88%) e a presença de associação de *pap-sfa* em 41%, resultado que se assemelha ao presente estudo que foi de 40% para associação *pap-sfa*, porém menor porcentagem para *pap* (60%) (Tabela 7).

JANTUNEM et al. (2000) observaram em seu estudo que o gene *pap* é encontrado mais frequentemente em isolados de crianças sem anormalidades anatômicas ou com anormalidades insignificantes, onde a presença desse gene de virulência é de grande importância para estabelecer a infecção e é considerado o gene mais comumente encontrado em amostras de *E.coli* extra-intestinal. Esse dado pode ser observado neste estudo onde das 5 amostras de ExPEC todas apresentaram o gene *pap* (Tabela 7).

Estudos anteriores revelaram a relação existente entre *pap* e fimbria P, DAIGLE et al. (1994) observaram que das 27 amostras *pap* positivas 26 amostras (96%) eram HAMR positiva, ou seja, apresentavam fimbria P, essa porcentagem é bem maior do que a encontrada neste estudo, no qual analisou 5 amostras de ExPEC e 3

apresentaram apenas o gene *pap*, destas somente 2 (66%) eram HAMR positivas (Tabela 5).

Em linhas gerais, as cepas de ExPEC do presente estudo apresentaram uma alta incidência para *pap* (60%) e uma forte associação *pap-sfa*, porém não foi encontrado o gene *afa*, resultado similar ao de BLANCO et al. (1997) que analisaram 243 amostras de *E.coli* isoladas de ITU e apenas 2% exibiam *afa*.

Apesar do baixo número de cepas ExPEC isoladas neste trabalho (5) a sua simples presença em retalhos de carne representa um motivo de alerta, pois caracteriza a carne como um veículo de disseminação deste patógeno, com todas as implicações inerentes a saúde pública.

A presença de ExPEC neste estudo deverá conscientizar as autoridades públicas e a vigilância epidemiológica do perigo e futuras complicações que as ExPEC, que causam infecções extra-intestinais no homem, vinculada aos alimentos de origem animal podem trazer a população.

7.CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- 1) Das 287 cepas de *E.coli*, 5 foram caracterizadas como ExPEC, sendo 3 oriundas de carne moída e 2 do moedor de carne.
- 2) As cepas isoladas que apresentaram a presença de 4 ou mais fatores de virulência foram caracterizadas como ExPEC.
- 3) Os fatores de virulência encontrados com maior frequência nas cepas de ExPEC foram aerobactina (100%) e hemolisina (80%).
- 4) Em todas as 5 cepas de ExPEC foram encontradas a presença de fímbria do tipo 1 e 60% delas também possuíam a fímbria P.
- 5) O gene *pap* foi o mais comumente encontrado neste estudo (60%), quando associado a *sfa* foi encontrado em 40% das cepas de ExPEC e o gene *afa* ausente em todas as cepas estudadas.
- 6) O perfil de resistência a antimicrobianos foi muito elevado para tetraciclina e estreptomicina (80%), porém adequado para amoxicilina-ácido clavulânico e ceftriaxona (0%), mostrando que são drogas utilizadas de forma racional.

8 Referências Bibliográficas

AHMED,A.A.; OSMAN,H.; MANSOUR, A.M.; MUSA, H.A.; AHMED, A.B.; KARRAR, Z.; HASSAN, H.S. Antimicrobial agent resistance in bacterial isolates from patients with diarrhea and urinary tract infection in the Sudan. **Am. J. Trop. Med.**, p.259-263, 2000.

APHA. American Public Health Association. Technical committee on microbiological methods for foods. Compendium for the Microbiological Examination of Foods, 3 ed.;1992.

BAUER,A.W. ; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, C.J.; TURCK,M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-496,1966.

BAUER, R.J.; ZHANG,L.; FOXMAN, B.; SIITONEN,A.; JANTUNEN, M.E.; SAXEN,H.; MARRIS, C.F.J.Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection - *usp*, *iha*, and *iro N* _{E.coli}. **Infect. Dis.**, v.185, p.1521-1524, 2002.

BERGEY`S. Manual of determinative bacteriology. 9th.ed. Baltimore: Willians of Wilkins, 1994.

BEUNDERS, A.J. Development of antibacterial resistance: the Dutch experience. **J. Antimicrob. Chemother.**, 33 (suppl.A), p.A17-22, 1994.

BIER,O. Microbiologia e imunologia. 24 ed. São Paulo, p.615-619, 1985

BINDEREIF, A.; NEILANDS, J.B. Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid Col V. **J. Bacteriol.**, v.153, n.2, p.1111-1113, 1983.

BINDEREIF, A.; NEILANDS, J.B. Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.161, n.2, p.727-735, 1985.

BINNS, M.M.; DAVIES, D.L.; HARDY, K.G. Cloned fragments of the plasmid Col V, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v.279, p.778-782, 1979.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOZ, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Rev. Microbiol.**, v.148, p.745-755, 1997.

BLOCK, J. G. Microbiology principles and explorations. 4 ed. Marymount University, 1999.

BLONDEAU, J.M.; VAUGHAN, D. A review of antimicrobial resistance in Canada. **Can. J. Microbiol.**, v.46, p.867-877, 2000.

BLUM, G.; OTT, M.; LISCHEWSKI, A.; RITTER, A.; IMRICH, H.; TSCHAPE, H.; HACHER, J. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of a *Escherichia coli* wild-type pathogen. **Infect. Immun.**, v.62, n.2, p.606-614, 1994.

BONACORSI, S.; HOUDOUIN, V.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; MAHJOUR-MESSAI, F.; BINGEN, E. Comparative prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* causing urinary tract infection in male infants with and without bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.3, p. 1156-1158, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 304 de 22 de abril de 1996. Disponível em : <[http:// www.agricultura.gov.br/dipoa/port304.html](http://www.agricultura.gov.br/dipoa/port304.html)>. Acesso em: 25 jul. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº145 de 1º de setembro de 1998. Disponível em: <[http:// www.agricultura.gov.br/dipoa/port145.html](http://www.agricultura.gov.br/dipoa/port145.html)>. Acesso em: 25 jul. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Portaria CVS – 6/99 de 10 de março de 1999. Disponível em <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 25 jul. 2006.

BRENNAND,G.; MAGALHÃES, M.; FERREIRA, L.C.S. Colicin production and serum resistance in pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from humans in north east Brazil. **Rev. Bras. Genet.**, v.3, n.12, p.465-476, 1989.

CARBONETTI, N.H.; WILLIAMS, P.H. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid Col V - K30. **Infect. Immun.**, v.46,n.1, p.7-12, 1984.

CAVALIERI, S.J.; BOHACH, G.A.; SNYDER,I.S. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, v.48, n.4, p.326-343, 1985.

CHESCA, A.C.; PEIXOTO, C.P.; COSTA, D.G.; NASCIMENTO, H.N.; PINTO, I.R.A.; GUIMARÃES, J.L.P.; TARQUINIO, L.B.; OKURA, M.H. Levantamento das temperaturas de armazenamento de carnes, em açougues e supermercados de Uberaba, MG. **Higiene Alimentar**, p.51-55, 2001.

CONCEIÇÃO, M.P.J.; FARIA, J.A.F.; GÂNDARA, A.L. Influência da temperatura de comercialização sobre a microbiota de carne bovina moída, em atmosfera modificada. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.67-72, 2003.

CORPET, D.E. Antibiotic resistance from food. **N. Engl. J. Med.**, v.318, n.18, p.1206-1207, 1988.

CULHAM, D.; WOOD, J.M. An *Escherichia coli* reference collection group B2- and uropathogen - associated polymorphism in the rpoS-mutS region of the *E.coli* chromosome. **J. Bacteriol.**,v.182, n.21, p.6272-6276, 2000.

DAIGLE,F.; HAREL,J.; FAIRBROTHER, J.M. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa- encoded fimbrial adhesin system among uropathogenic *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, v.40, p.286-291,1994.

DAVIES, D.L.; FALKINER, F.R.; HARDY, K.G. Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.31, n.2, p.574-579, 1981.

DUGUID,J.P.; SMITH, I.W.; DEMPSTER, G.; EDMUNDS, P.N. Non-flagellar filamentous appendages ("Fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. **J. Path. Bact.**, v.70, p.335-348, 1955.

EBERSPÄCHER, B.; HUGO, F.; BHAKDI, S. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. **Infect. Immun.**, v.57, n.3, p.983-988, 1989.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. Identification of enterobacteriaceae. 3rded. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972.

EMODY, L.; MOLNAR, L.; KELLERMAYER, M.; PAÁL, M.; WADSTROM, T. Urinary *Escherichia coli* infection presenting with jaundice. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.21, p.579-582, 1989.

FELMLEE,T.; PELLETT,S.; WELCH, R. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. **J. Bacteriol.**, v.163, n.1, p.94-105, 1985.

FERNANDEZ-BEROS, M.E.; KISSEL, V.; CABELLO, F.C. Aerobactin-mediated iron uptake system in intestinal *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.49, p.397-401, 1988.

FERREIRA, M.G.A.B.; SOBRINHO, A.J.C. Avaliação da qualidade bacteriológica das carnes bovina moída e suína (pernil) “*in natura*” e/ou refrigerada, em supermercados, frigoríficos e feiras livres do município de São Luís, MA. **Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p.87-93, 2003.

FÜNFSTÜCK, R.; TSCHAPE, H.; STEIN, G.; VOLLANDT, R.; SCHNEIDER, S. Virulence of *Escherichia coli* strains in relation to their hemolysin formation, mannose-resistant hemagglutination, hydroxamate production, K 1-antigen and the plasmid profile in patients with chronic pyelonephritis. **Clin. Nephrology**, v.32, n.4, p.178-184, 1989.

GARAU, J.; XERCAVINS, M.; RODRÍGUEZ-CARBALLEIRA, M.; GÓMEZ-VERA, J.R.; COLL, I.; VIDAL, D.; LLOVET, T.; RUÍZ-BREMÓN, A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.43, n.11, p.2736-2741, 1999.

GORBACH, S.L. Antimicrobial use in animal feed – time to stop. **N. Engl. J. Med.**, v.345, n.16, p.1202-1203, 2001.

GREEN, C.P.; THOMAS, V.L. Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria. **Infect. Immun.**, v.31, n.1, p.309-315, 1981.

GRUNEBERG, R.N. Changes in urinary pathogens and their antibiotic sensitivities. **J. Antimicrob. Chemother.**, 33(Suppl.A), p.S1-8, 1994.

GUARDA, M.A.; LANDINI, M.P.; LA PLACA, M.; NANETTI, A. Drug resistance and plasmid mediated transfer of drug resistance in *Escherichia coli* isolated from various districts of the human organism. A possible relationship with the antimicrobial drug concentrations during therapy. **J. Infect. Dis.**, v.13, p.432-436, 1976.

GUIGNOT, J.; BREARD, J.; BERNET-CAMARD, M.F.; PEIFFER, I.; NOWICKI, B.J.; SERVIN, A.L.; BLANC-POTARD, A.B. Pyelonephritogenic diffusely adhering *Escherichia coli* EC7372 harboring Dr-II adhesin carries classical uropathogenic virulence genes and promotes cell lysis and apoptosis in polarized epithelial caco-2/TC7 cells. **Infect. Immun.**, v.68, n.2, p.7018-7027, 2000.

GUYER, D.M.; GUNTHER, N.W.; MOBLEY, H.L.T. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, (Suppl 1), p.S32-35, 2001.

HACKER, J.; HUGHES, C.; HOF, H.; GOEBEL, W. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. **Infect. Immun.**, v.42, n.1, p.57-63, 1983.

HAGBERG, L.; JODAL, U.; KORHONEN, T.K.; LIDIN-JANSON, G.; LINDBERG, U.; SVANBORG EDÉN, C. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Infect. Immun.**, v.31, n.2, p.564-570, 1981.

HUGHES, C.; HACKER, J.; ROBERTS, A.P.; GOEBEL, W. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.39, n.2, p.546-551, 1983.

HULL, S.; HULL, R.A.; MINSHEW, B.H.; FALKOW, S. Genetics of hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.151, n.2, p.1006-1012, 1982.

INUKAI, Y.; KODAMA, H. Studies on hemolytic *Escherichia coli* of O-139: a certain factor essential for hemolysin production. **J. Vet. Res.**, v.13, p.87-95, 1965.

JACKSON, T.C.; MARSHALL, D.L.; ACUFF, G.R.; DICKSON, J.S. Meat, poultry, and seafood. Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2nd ed., Washington, ASM Press, p.91-109, 2001.

JAMES, S. The chill chain "from carcass to consumer". **Meat Science**, v.43, p.203-216, 1996.

JANTUNEN, M.E.; SIITONEN, A.; KOSKIMIES, O.; WILSTRÖM, S.; KÄRKKÄINEN, U.M.; SALO, E.; SAXÉN, H. Predominance of class II pap G allele of *Escherichia coli* in pyelonephritis in infants with normal urinary tract anatomy. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.1822-1824, 2000.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Microbiologia médica, 20 ed., p.99-129, 1998.

JOHNSON, J.R.; MONSELEY, S.L.; ROBERTS, P.; STAMM, W.E. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. **Infect. Immun.**, v.56, p.405-412, 1988.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.80-128, 1991.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.261-272, 2000.

JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A.L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.78-88, 2001 a.

JOHNSON, J.R.; O'BRYAN, T.; KUSKOWSKI, M.; MASLOW, J. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *pap A* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. **Infect. Immun.**, v.69, n.9, p.5363-5374, 2001 b.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad E.coli". **J. Lab. Clin. Med.**, v.139, n.3, p.155-162, 2002 a.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. **J.Infect. Dis.**, v.186, p.859-864, 2002 b.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; O'BRYAN, T.T.; KUSKOWSKI, M.; NOWICKI, B.; JOHNSON, C.; MASLOW, J.N.; KAUL, A.; KAVLE, J.; PRATS, G. Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: Evidence of distribution beyond Europe. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.6, p.1913-1923, 2002.

JOHNSON, J.R.; MURRAY, A.C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M.A.; SMITH, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, n.7, p.2161-2168, 2003.

JOHNSON, J.R.; KUSKOWSKI, M.A.; SMITH, K.; O'BRYAN, T.T.; TATINI, S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **J. Infect. Dis.**, v.191, p.1040-1049, 2005.

JORGENSEN, S.E.; SHORT, E.C.; KURTZ, H.J.; MUSSEN, H.K.; WU, G.K. Studies on the origin of the α -haemolysin produced by *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v.9, p.173-189, 1976.

KÄLLENIUS,G.; SVENSON, S.B.; HULTBERG, H.; MÖLLBY, R.; HELIN, I.; CEDERGREN, B. Occurrence of P fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. **Lancet** , p.1369-1372, 1981.

KAUFFMAN, F.Z. Serologie der Coli-Gruppe. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, p.20-21, 1944.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A.; The Study Group. EPEC, EAEC, and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** v.40, p.151-156, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL Jr., V.R.; SOMMERS, H.M. Diagnóstico microbiológico - Texto e atlas colorido. 2ª ed., São Paulo, Editora panamericana, p.61-132, 1993.

KÖNIG, B.; KÖNIG, W.; SCHEFFER, J.; HACKER, J.; GOEBEL, W. Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. **Infect. Immun.**, v.54, p.886-892, 1986.

LATHAM, R.H.; STAMM, W.E. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies. **J. Infect. Dis.**, v.149. n.6, p.835-840, 1984.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.5, p.1189-1193, 1992.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; SENA, E. N. Condições higiênico-sanitárias de “Fast-Food” e restaurantes da região metropolitana da cidade do Recife – PE. **Higiene Alimentar**, v.12, n.57, p.50-55, 1998.

LINGGOOD, M.; ROBERTS, M.; FORD, S.; PARRY, S.H.; WILLIAMS, P.H. Incidence of the aerobactin uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, p.835-842, 1987.

LINTON, A.H.; HOWE, K.; BENNETT, P.M.; RICHMOND, M.H. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. **J. Applied Bact.**, v.43, p.465-469, 1977.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D. Guia de terapia antiinfecçiosa, v.1, p.11-44,1998.

LOW, D.; DAVID, V.; LARK, D.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW, S. Gene clusters governing the production of hemolysin and mannose-resistant hemagglutination are closely linked in *Escherichia coli* serotype O4 and O6 isolates from urinary tract infections. **Infect. Immun.**, v.43, n.1, p.353-358, 1984.

MAHMOOD, A.; ENGLE, M.J.;HULTGREN, S.J.; GOETZ, G.S.; DODSON, K.; ALPERS, D.H. Role of intestinal surfactant-like particles as a potential reservoir of uropathogenic *Escherichia coli*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1523, p.49-55, 2000.

MARTINEZ, J.L.; CERCENADO, E.; BAQUERO, F.; PÉREZ-DIAZ, J.C.; DELGADO-IRIBARREN, A. Incidence of aerobactin production in Gram-negative hospital isolates. **FEMS Microbiol. Letters**, v.43, p.351-353, 1987.

MARTINS, S.C.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B.; SERIO, J.; MATTEI, A.C.M.L.; RODRIGUES, M.S.V. Avaliação microbiológica de pontos críticos de controle no fluxograma de preparação de carne bovina em unidade de nutrição. **Higiene Alimentar**, v.15, n.88, p.84-89, 2001.

MARTINS, S.C.S.; LIMA, J.R.; ALMADA, J.S.; PEREIRA, A.I.B. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal no estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.20, p.70-76, 2004.

MENDES, A.C.R.; SANTANA NETA, L.G.; COSTA, D.S.; ALMEIDA, J.F. Condições de comercialização de cortes cárneos em supermercados da cidade de Salvador, BA. **Higiene Alimentar**, v.15, n.83, 2001.

MINSHEW, B.H.; JORGENSEN, J.; COUNTS, G.W.; FALKOW, S. Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Infect.Immun.** v.20, n.1, p.50-54, 1978.

MITSUMORI, K.; TERAJ, A.; YAMAMOTO, S.; ISHITOYA, S.; YOSHIDA, O. Virulence characteristics of *Escherichia coli* in acute bacterial prostatitis. **J. Infect. Dis.**, v.180, p.1378-1381, 1999.

MOBLEY, H.L.T.; GREEN, D.M.;TRIFILLIS, A.L.; JOHNSON, D.E.; CHIPPENDALE, G.R.; LOCKATELL, V.; JONES, B.D.; WARREN, J.W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cell: role of hemolysin in some strains. **Infect. Immun.**, v.58, n.5, p.1281-1289, 1990.

MONTGOMERIE, J.Z.; BINDEREIF, A.; NEILANDS, J.B.; KALMANSON, G.M.; GUZE, L.B. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. **Infect. Immun.**, v.46, n.3, p.835-838,1984.

MORELLO, J.A. Microbiology in patient care. 4 ed, p.457-459, 1984.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**, seventh ed., Approved standard M2-A7. Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2000.

NORMARK, S.; LARK, D.; AULL, R. Genetics of digalactoside-binding adhesin from a uropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.** v.41, p.942-949, 1983.

O'HANLEY, P.; LOW, D.; ROMERO, I.; LARK, D.; VOSTI, K.; FALKOW, S.; SCHOOLNIK, G. Gal-Gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*. **N. Engl. J. Med.**, v.313, n.7, p.414-420, 1985.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Weekly. Epidemiological Records – Geneva. n.14, p. 105-112, abr. 1999. Disponível em: <<http://who.int/wer>>. Acesso em: 25 jul. 2006.

OPAL, S.M.; CROSS, A.S.; GEMSKI, P.; LYHTE, L.W. Aerobactin and α -hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. **J. infect. Dis.**, v.161, p.794-796, 1990.

PANETTA, J.C. O manipulador: fator de segurança e qualidade dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.57, p.8-9, 1998.

PARDI, M.C. Ciência, Higiene e Tecnologia da carne. Editora UFG, Goiânia, 1995.

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia, conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, v.2, p.111-125, 1997.

PERUGINI, M.R.E.; VIDOTTO, M.C. Características clínicas e virulência de *Escherichia coli* em infecções do trato urinário. **Semina Ci. Biol.**, v.13, n.2, p.33-39, 1992.

PERUGINI, M.R.E.; VIDOTTO, M.C. Frequency of pap and pil operons in *Escherichia coli* strains associated with urinary infections. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.351-357, 1996.

RAZ, R.; CHAZAN, B.; KENNES, Y.; COLODNER, R.; ROTTENSTERICH, E.; DAN, E.; LAVI, I.; STAMM, W.; Israel Urinary Tract Infection Group. Empiric use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) in the treatment of women with uncomplicated urinary tract infections, in a geographical area with a high prevalence of TMP-SMX-resistant uropathogens. **Clin. Infect. Dis.** , v.34, p.1165-1169, 2002.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.1753-1754, 2000.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Spring Harbor. Laboratory Press, 1999.

SCHEFFER, J.; KONIG, W.; HACKER, J.; GOEBEL, W. Bacterial adherence and hemolysin production from *Escherichia coli* induces histamine and leukotriene release from various cells. **Infect. Immun.**, v.50, n.1, p.271-278, 1985.

SCHROEDER, C.M.; WHITE, D.G.; GE, B.; ZHANG, Y.; McDERMONTT, P.F.; AYERS, S.; ZHAO, S.; MENG, J. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. **Inter. J. Food Microbiology**. V.85, p.197-202, 2003.

SENAC. Curso: Manipulação higiênico-sanitária de carnes frescas e temperadas. São Paulo, 2006.

SHARMA, S.; HARJAI, K.; MITTAL, R. Enhanced siderophore production and mouse kidney pathogenicity in *Escherichia coli* grown in urine. **J. Med. Microbiol.**, v.35, p.325-329, 1991.

SHOEMAKER, N.B.; VLAMAKIS, H.; HAYES, K.; SALYERS, A.A. Evidence for extensive resistance gene transfer among bacteróides spp. And among Bacteróides and other genera in the human colon. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.2, p.561-568, 2001.

SILVA Jr.; MARTINS, E.A. Análise microbiológica em cozinhas industriais. **Higiene Alimentar**, v.5, n.17, p.20-24, 1991.

SILVA, J.A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.65, p.19-25, 1999.

SILVEIRA, W.D.; BENETTI, F.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, A.; SOLFERINI, V.N.; BROCCHI, M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.43, n.6, p.303-310, 2001.

SMITH, H.W. The haemolysins of *Escherichia coli* . **J. Pathol. Bacteriol.**, v.85, p.197-211, 1963.

SMITH, H.W. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E.coli* in the alimentary tract of man. **Lancet**, p.1174-1176, 1969.

SMITH, H.W. A search for transmissible pathogenic characteres in invasive *Escherichia coli* the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated or identifical with colicin V. **J. Gen. Microbiol.**, v.83, p.95-111, 1974

STAPLETON, A.; MOSELY, S.; STAMM, W.E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.773-779, 1991.

SVANBORG-EDÉN, C.; HANSSON, H.A. *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.21, n.1, p. 229-237, 1978.

TOMISAWA, S.; KOGURE, T.; KUROUME, T.; LEFFLER, H.; LOMBERG, H.; SHIMABUKORO, N.; TERAQ, K.; SVANBORG-EDÉN, C. P blood group and proneness to urinary tract infection in Japanese children. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.21, p.404-408, 1989.

VÄISANEN, V.; TALLGREN, L.G.; MÄKELÄ, P.H.; KÄLLENIOUS, G.; HULTBERG, H.; ELO, J.; SIITONEM, A.; SVANBORG-EDÉN, C.; SVENSON, S.B.; KORHONEN, T. Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. **Lancet.**, v.16/26, p.1366-1369, 1981.

VÄISANEN-RHEN, V.; ELO, J.; VÄISANEN, E.; SIITONEM, A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, A.; ORSKOV, F.; SVENSON, S.B.; MÄKELÄ, P.H.; KORHONEN, T.K. P -fimbriated cones among uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v.43, n.1, p.149-155, 1984.

VALVANO, M.A.; CROSA, J.H. Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain Col V plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of *Escherichia coli* K1. **Infect. Immun.**, v.46, p.159-167, 1984.

VALVANO, M.A.; SILVER, R.P.; CROSA, J.H. Occurrence of chromosome or plasmid-mediated aerobactin iron transport systems and hemolysin production among clonal groups of human invasive strains of *Escherichia coli* K1. **Infect. Immun.**, v.52, n.1, p.192-199, 1986.

VAN DEN BOSCH, J.F.; SOHMER, U.V.; POSTMA, P.; GRAAFF, J.; MacLAREN, D.M. Mannose-sensitive and mannose-resistant adherence to human uroepithelial cells and urinary virulence of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.29, p.226-233, 1980.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne pathogens. An illustrated text. Marison Publishing, p.501, 1996.

VELASCOS, M.; HORCAJADA, J.P.; MENSA, J.; MORENO-MARTINEZ, A.; VILA, J.; MARTINEZ, J.A.; RUIZ, J.; BARRANCO, M.; ROIG, G.; SORIANO, E. Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p.1682-1686, 2001.

VIDOTTO, M.C.; MULLER,E.E.; FREITAS,J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G.; SANTOS, D.S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.34, p.531-538, 1990.

WAALWIJK, C.; MacLAREN, D.M.; GRAAFF, J. In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.42, n.1, p.245-249, 1983.

WAGNER, W.; VOGEL, M.; GOEBEL, W. Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. **J. Bacteriol.**, v.154, n.1, p.200-210, 1983.

WALTON, J.R.; SMITH, D.H. New hemolysin (γ) produced by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.98, p.304-305, 1969.

WATANABE, D.S.A.; DECARLIS, R.M.S.T.; MICHELIN, L.A.; MONTELLI, A.C. Fatores de virulência de amostras urinárias de *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, v.19, p.123-128, 1988.

WATERS, V.L.; CROSA, J.H. Colicin V virulence plasmids. **Microbiol. Rev.**, v.55, n.3, p.437-450, 1991.

WILLIAMS, P.H. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.26, n.3, p.925-932, 1979.

WILLIAMS, P.H.; CARBONETTI, N.H. Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.51, n.3, p.942-947, 1986.

WINOKUR, P.L.; VONSTEIN, D.L.; HOFFMAN, L.J.; UHLENHOPP, E.K.; DOERN, G.V. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. **Antimicrob. Agents and Chemother.** V.45, p.2716-2722, 2001.

WOLD, A.E.; CAUGANT, D.A.; LINDIN-JANSON, G.; MAN, P.; SVANBORG, C. Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. **J. Infec. Dis.** v.165, p.46-52, 1992.

YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.12, p.85-90. 1995.

YOUMANS, G.P.; PATERSON, P.Y.; SOMMERS, H.M. Bases biológicas e clínicas das doenças infecciosas. 2.ed., p.809-879, 1983.

SUMMARY

For ten months, at Taquaritinga city, São Paulo State, we have conducted an analysis over meat conditions, at 23 butcheries. In this survey we collected two hundred eighty seven generic *Escherichia coli* from ground beef, mincers and of the hands of meat manipulators. Five of these isolates were recognized as Extraintestinal Pathogenic *E.coli* (ExPEC) strains.

The presence of fimbriae, hemolysin production, aerobactin and colicin. were investigated, as well the existence of genes (*pap*, *afa*, *sfa*) related to fimbriae expression, using a Polimerase Chain Reaction (PCR).

In this ExPEC strains, we have verified the presence of aerobactin and fimbriae type 1 (100%), hemolysin (80%) and related results for colicin and P fimbriae (60%). We also confirmed that 60% of ExPEC strains exhibited *pap*, and 40% were simultaneously, *pap-sfa*.. From twelve antimicrobial agents tested, we found a resistance level (80%) to multiple antimicrobial agents (≥ 3). The most efficient antimicrobial agents were: ceftriaxone and amoxicilin-clavulanic acid (0%) resistance, followed by a satisfactory resistance for ampicillin, amoxicilin, ciprofloxacin and gentamicin (20%). In contrast, we found a high level of resistance (80%) for tetracycline and streptomycin.

From this study, we have concluded that meat can be a very important vehicle for community dissemination of ExPEC, which may represent a reason of concern.

Keywords: ground beef, butchery, virulence factors

