

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE**  
***Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJOS PRODUZIDOS A**  
**PARTIR DE LEITE NÃO PASTEURIZADO**

**Laryssa Freitas Ribeiro**

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE**  
***Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJOS PRODUZIDOS A**  
**PARTIR DE LEITE NÃO PASTEURIZADO**

**Laryssa Freitas Ribeiro**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Co-orientador: Dr. Renato Pariz Maluta

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

**2013**

Ribeiro, Laryssa Freitas  
R484c Características fenotípicas e genotípicas de *Escherichia coli* isoladas de queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado / Laryssa Freitas Ribeiro. – –Jaboticabal, 2013.  
ix, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013  
Orientador: Luiz Augusto do Amaral  
Banca examinadora: Karina Paes Bürger, Maria Izabel Merino  
de Medeiros

Bibliografia

1. Clones 2. Grupo Filogenético 3. PCR 4. Resistência  
Antimicrobiana 5. Saúde Pública 6. Sorogrupo I. Título. II. Jaboticabal  
- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614:31:637.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de  
Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: [laryssaribeiro84@gmail.com](mailto:laryssaribeiro84@gmail.com)



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL**

### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJOS PRODUZIDOS A PARTIR DE LEITE NÃO PASTEURIZADO

**AUTORA:** LARYSSA FREITAS RIBEIRO

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. RENATO PARIZ MALUTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Campinas/SP

Data da realização: 25 de fevereiro de 2013.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LARYSSA FREITAS RIBEIRO** – Nascida na cidade de Uberaba, Minas Gerais, em 09 de outubro de 1984. Médica Veterinária, formada pela Universidade Estadual Paulista (CARDOSO), câmpus de Jaboticabal. Realizou estágio na mesma universidade Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva, no laboratório especializado em inspeção de alimentos, sob a supervisão do professor Dr. Luiz Augusto do Amaral, teve duas iniciações científicas com bolsa da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante seu estágio curricular foi para o Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá, sob a supervisão do prof Dr. John Morris Fairbrother, onde acompanhou e executou atividades, melhorando seu conhecimento teórico e prático. Em agosto de 2011 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da UNESP, câmpus Jaboticabal, também sob a supervisão do prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, e também com bolsa FAPESP, estagiando mais uma vez no Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Voltou ao Brasil, dando continuidade à esse programa.

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

Chico Xavier

Dedico essa conquista, com muita gratidão  
Aos meus pais, João Ulisses e Elza,  
Ao meu irmão, Ulisses,  
Que sempre compartilham meus ideais!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida, me dando força, coragem e saúde para nunca desistir dos meus sonhos;

Aos meus queridos pais, João Ulisses Ribeiro e Elza Aparecida de Freitas, meus exemplos de vida, força, dedicação, amor e honestidade, valores importantes para minha formação. Obrigada pela dedicação em todas as fases da minha vida, por me apoiarem sempre, mesmo que isso signifique sacrifícios;

Ao meu irmão, Ulisses Freitas Ribeiro, porque é na sua força de vontade que me espelho para enfrentar os desafios da vida. Obrigada por torcer tanto pela minha felicidade e, principalmente, por fazer parte dela;

À minha segunda mãe, minha Luzia, pelo carinho que tem comigo. Seu apoio e amor incondicional me ajudaram a vencer mais essa etapa da minha vida;

Às minhas “Lu”s” Zago (Luana e Luciana) e Ju Zago, primas e irmãs de coração!

À minha família, meu porto seguro, minha base de tudo.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, pela oportunidade, paciência, por todo aprendizado, confiança, orientação e amizade em todos esses anos. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. Renato Pariz Maluta, meu co-orientador e amigo, pela paciência e pelos conselhos, pelas valiosas sugestões para a conclusão desse trabalho. Hoje muito do que sei e sou, devo a você.

To Dr. John Morris Fairbrother, my supervisor in Canada, for the incredible opportunity to go to University of Montreal (UdeM), one of the top universities worldwide. Thanks to believe in me, for all teachings and patience, and for your friendship. This project is read and it is our victory!

Às colegas Mônica Costa Oliveira, Viviane de Souza, Maria Izabel Merino de Medeiros e Lucimara Antonio Borges, pelas amostras de queijos cedidas.

Às colegas e amigas, com muito orgulho, prof Dr. Fernanda de Rezende Pinto e prof. Mestre Mayhara Martins Cordeiro Barbosa, por me ensinar muito do que sei nessa área. Muito obrigada pela paciência de sempre, pela amizade de vocês que nasceu no laboratório e eu levo pra uma vida toda.



À Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Júnior (Diba), pela paciência, conselhos e amizade em todos esses anos no laboratório.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e à FCAV UNESP Jaboticabal pela oportunidade.

Às minhas amigas e amigos que fazem diferença em minha vida: Aline Costa (Bru), Ane Milaré, Bel Medeiros, Camila Prosdocime (Itu), Carlos Eduardo Gamero (Kadu/Erection) Carol Abrahão, Carol Nogueira (Franga), Carol Zani, Carolle Muterlle, Érica Siqueira, Iggor Azevedo (Mentor), Isabela Navarro (Xaxá), Letícia Lavezzo (Selv`s), Lu Seabra, Maite Del Collado (Tetxu), Priscila Arrigucci (Mury), Raquel Jacob, Roberta Gaspar (Colgate), Rodolpho Cavalcanti (Espirro) e Thiago de Melo, nenhum ser humano é completo sem ter amigos. Amigos de verdade estão conosco nos melhores momentos, mas também são nosso chão quando precisamos cair. Eu não sei o que seria de mim se não tivesse amigos. Obrigada pela convivência, pela confiança, mesmo estando longe. Amo vocês!

Às meninas da Rep. "As Coyotes", minha segunda casa, onde passei um dos melhores momentos da minha vida. Hoje posso dizer que vocês também são minha família. Obrigada por todos os momentos, de alegria, de bagunça, de raiva, de tristeza, de emoção, porque todos eles me fizeram crescer e ser uma pessoa melhor.

Às meninas do Canadá, minhas irmãs de coração, Kalyne Bertolin e Natália Rodrigues, às quais estou sempre com saudades. Obrigada por tudo que são para mim. Em muito pouco tempo de convivência puderam me mostrar o verdadeiro valor da amizade. Obrigada por me deixarem fazer parte da família de vocês.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram para a conclusão desse trabalho, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas.....	iii
Lista de figuras.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. O leite, a produção e o consumo de queijos.....	2
2.2. Queijo como origem de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVSs).....	4
2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.4. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	8
2.5. <i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica (STEC) .....	9
2.6. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC) .....	10
2.7. <i>Escherichia coli</i> extra intestinal (ExPEC) .....	10
2.8. Classificação filogenética de <i>E. coli</i> .....	11
2.9. Uso indiscriminado de antimicrobianos em vacas leiteiras.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Introdução e origem das amostras.....	15
4.2. Isolamento de <i>E. coli</i> .....	19
4.3. Pesquisa de genes de virulência.....	22
4.4. Preparação do DNA template das cepas identificadas como <i>E. coli</i> .....	24
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para agrupamento filogenético.....	24
4.6. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência.....	26
4.7. Análise molecular para identificação de genes de resistência através da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28

4.8.	Sorologia para detecção do antígenos somático (O) .....	31
4.9.	Análise epidemiológica das cepas por gel de eletroforese de campo pulsado.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1.	A prevalência de <i>E. coli</i> em queijos elaborados a partir de leite cru foi maior em Aracaju/SE.....	33
5.2.	A maioria dos isolados de <i>E. coli</i> em queijos produzidos a partir de leite cru pertencem aos grupos filogenéticos A e B1.....	35
5.3.	A resistência aos antimicrobianos foi moderada nas três cidades e <i>tetB</i> foi o gene mais comumente encontrado.....	37
5.4.	Os sorogrupos O4, O18 e O23 foram os sorogrupos mais encontrados.....	43
5.5	O gene de resistência para ampicilina, <i>bla<sub>TEM</sub></i> , foi encontrado apenas no grupo filogenético A.....	45
5.5.	Clones foram encontrados em isolados de diferentes cidades, diferentes queijos e de mesmos queijos.....	47
6.	CONCLUSÕES.....	50
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8.	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO 1.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e o fragmento de DNA <i>tspe4c2</i> , tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento.....	26
<b>Tabela 2.</b>	Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>blaCmy</i> , <i>blaTem</i> , controles positivos usados, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento.....	29
<b>Tabela 3.</b>	Pools de anti-soros polivalentes e seus respectivos anti-soros monovalentes que foram utilizados para detecção do antígeno somático (O).....	32
<b>Tabela 4.</b>	Número de amostras positivas para <i>E.coli</i> nos três diferentes municípios do Brasil, de acordo com a quantidade de queijos colhidos de cada município.....	34
<b>Tabela 5.</b>	Número total de isolados de <i>E. coli</i> de queijos elaborados a partir de leite cru em cada grupo filogenético nos três diferentes municípios no Brasil.....	35
<b>Tabela 6.</b>	Resistência antimicrobiana em isolados <i>E. coli</i> de queijos produzidos a partir de leite cru em três diferentes cidades no Brasil baseado no método de disco - difusão.....	38
<b>Tabela 7.</b>	Resistência antimicrobiana em isolados de <i>E. coli</i> de queijos elaborados a partir de leite cru de acordo com o agrupamento filogenético dos isolados baseado no método disco-difusão.....	41
<b>Tabela 8.</b>	Quantidade de isolados dos principais sorogrupos encontrados nos três municípios onde foram feitas as coletas.....	45
<b>Tabela 9.</b>	Relação entre grupo filogenético e sorogrupo O em <i>E. coli</i> de queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado em três municípios.....	44
<b>Tabela 10.</b>	Isolados de <i>E. coli</i> de queijos provenientes de leite cru positivos para genes de resistência relacionados com o grupo filogenético (GF).....	46

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Parte do mapa do Brasil, visualizando os três municípios nas quais as amostras foram colhidas (<https://maps.google.com.br/>, 2012)..... 16
- Figura 2.** Supermercado no município de Uberaba/MG, onde foi feita a colheita dos queijos elaborados a partir de leite cru, sendo que todos estavam refrigerados e um dos queijos colhidos, mostrando a inscrição do produtor e o cadastro no IMA. Uberaba/MG, 2010..... 17
- Figura 3.** Estabelecimentos, feiras e vendedores ambulantes onde foram feitas as colheitas de queijos elaborados a partir de leite cru em Aracaju/SE, mostrando a forma como eles estavam mantidos, sem refrigeração e a situação dos queijos, com grande quantidade de olhaduras. Aracaju/SE, 2010..... 18
- Figura 4.** Mercado Municipal de Ribeirão Preto/SP, lugar em que foi feita a colheita de queijos elaborados a partir de leite cru, mostrando que os queijos não ficavam sob refrigeração e muitas vezes sem embalagens. Ribeirão Preto/SP, 2010..... 19
- Figura 5.** Placa de EMB com colônias verde brilhantes, características de *E. coli*. Jaboticabal/SP, 2010..... 20
- Figura 6.** Testes bioquímicos feitos para a identificação de *E. coli*. Indol positivo (coloração vermelha permanente e formação de anel vermelho na superfície do meio), VM positiva (formação de anel vermelho na superfície do meio), VP negativa (coloração da superfície amarelo/esverdeada) e citrato negativo (ágar continua verde). Jaboticabal/SP, 2010..... 21

- Figura 7.** Eletroforese dos produtos de amplificação por PCR para a detecção dos genes para ETEC (*f4*, *stb*, *lt*, *sta*), STEC e EPEC (*stx1*, *stx2*, *eae*) e ExPEC (*iuc*, *tsh*, *papc*, *cnf*) de isolados de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado dos estudos preliminares. Poço 5 – controle positivo (CP, ou seja, utilização de DNA de isolado positivo para o gene investigado), poço 6 – controle negativo (CN, ou seja, utilização de água Milli-Q estéril e filtrada) e poço 7 – marcador..... 23
- Figura 8.** Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético cepa de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chua*, *yjaa* e *tspe4* (CLERMONT, et. al, 2000)..... 25
- Figura 9.** Placa de ágar Mueller-Hinton pronta para leitura dos halos de inibição. Saint-Hyacinthe, QC, Canadá, 2012..... 27
- Figura 10.** Eletroforese de produtos de amplificação por PCR para a detecção dos genes de resistência *aadA1*, *tetA*, *tetB*, *blaCmy* e *blaTem* de isolados de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado. CP (controle positivo - utilização de DNA de isolado positivo para o gene investigado), CN (controle negativo - utilização de água Milli-Q estéril e filtrada) e PM (marcador molecular de peso molecular conhecido - PB,100 pb DNA Ladder - Invitrogen®). Saint-Hyacinthe/QC, Canadá, 2012..... 30
- Figura 11.** A - reação positiva (aglutinação) e B – reação negativa para detecção do antígeno somático (O) de isolados de *E. coli* provenientes de queijos elaborados a partir de leite cru. Saint-Hyacinthe, QC, Canadá, 2012..... 31
- Figura 12.** Eletroforese de campo pulsado de *E. coli* isoladas de queijos elaborados de leite não pasteurizado. Nos poços 1, 5, 10 e 15 observa-se o padrão de DNA de *Salmonella* sorovar Braenderup H9812 digerido com enzima XbaI..... 33

**Figura 13.** Resultado da eletroforese em campo pulsado (PFGE) entre os isolados de diferentes queijos em três diferentes municípios. O dendrograma foi feito usando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização e construído com o método de agrupamento UPGMA, usando-se o programa BioNumerics 5.0..... 48

## CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJOS PRODUZIDOS A PARTIR DE LEITE NÃO PASTEURIZADO

**RESUMO** - Os queijos elaborados a partir de leite cru são muito consumidos no Brasil. No entanto, sua elaboração realizada por pessoas não capacitadas pode resultar em sua contaminação por vários micro-organismos, incluindo *Escherichia coli*, afetando a qualidade microbiológica do queijo e representando risco potencial para a saúde dos consumidores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características fenotípicas e genotípicas de estirpes de *Escherichia coli* isoladas em amostras de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado em três cidades, para avaliar o possível risco potencial deste tipo de queijo para a população humana. Para tanto, 83 queijos foram coletados em cada um dos três diferentes municípios, Uberaba / Minas Gerais (30), Ribeirão Preto / São Paulo (22) e Aracaju / Sergipe (31) no ano de 2010. Os isolados foram cultivados em ágar EMB e, no ano de 2012, analisados o grupo filogenético por PCR, o sorogrupo O por aglutinação, a resistência antimicrobiana por difusão em disco, a presença de genes de resistência antimicrobiana por PCR, e campo pulsado por eletroforese em gel. O número de amostras positivas para *E. coli* foi maior na cidade de Aracaju (90,32%) e os isolados de *E. coli* da cidade de Uberaba demonstraram alta resistência antimicrobiana (92,30%). A maior parte dos isolados pertencia ao grupo filogenético A (54,4%) e B1 (44,3%). A resistência aos antimicrobianos foi moderada, sendo que a maior prevalência foi do município de Uberaba (56,7%). Houve isolados com genes de resistência a antimicrobianos, sendo que o gene *tetB* foi o gene mais comumente encontrado. Os sorotipos mais observados foram O4, O18 e O23, importantes como causadores de doenças extra intestinais, como meningite e infecção do trato urinário. Clones de *E. coli* foram encontrados em amostras de queijos na mesma cidade e em cidades diferentes e houve, também uma alta variabilidade genética, indicando que este tipo de alimento pode ser contaminado em diferentes pontos durante a cadeia produtiva. Os resultados permitem concluir que esses queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado possuem má qualidade higiênica e estirpes de *E. coli* potencialmente patogênica, e, por esse motivo, representam um risco potencial à saúde pública.

**Palavras-chave:** Clones, Grupo Filogenético, PCR, Resistência Antimicrobiana, Saúde Pública, Sorogrupo



## PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM CHEESE MADE FROM MILK NOT PASTEURIZED

**ABSTRACT** - The cheeses made from raw milk is widely consumed in Brazil. However, preparation is performed by people not trained and can result in contamination by various micro-organisms, including *Escherichia coli*, affecting the microbiological quality of cheese and representing potential risk to consumer health. The objective of this study was to assess the phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated in samples of cheeses made from unpasteurized milk in three cities, to assess the possible risk potential of this type of cheese for the human population. For this, 83 cheeses were collected in each of three different municipalities, Uberaba / Minas Gerais (30), Ribeirão Preto / São Paulo (22) and Aracaju / Sergipe (31) in 2010. The isolates were cultured on agar and EMB, and in 2012, analyzed the phylogenetic group by PCR, serogroup by agglutination, antimicrobial resistance by disk diffusion, the presence of antimicrobial resistance genes by PCR and pulsed field by gel electrophoresis. The number of samples positive for *E. coli* was higher in the city of Aracaju (90.32%) and *E. coli* isolated from Uberaba demonstrated high antimicrobial resistance (92.30%). Most isolates belonging to the phylogenetic group A (54.4%) and B1 (44.3%). Antimicrobial resistance was moderate, and the highest prevalence was at Uberaba (56.7%). There were isolates with antimicrobial resistance genes, and the gene *tetB* was the gene most commonly found. The serotypes most frequently observed were O4, O18 and O23, important as disease causing extra bowel, such as meningitis and urinary tract infection. *E. coli* clones were found in samples of cheeses in the same city and in different cities and there was also a high genetic variability, indicating that this type of food can be contaminated at different points during the production chain. The results indicate that these cheeses made from unpasteurized milk have poor hygienic and *E. coli* potentially pathogenic, and, therefore, represent a potential risk to public health.

**Keywords:** Antimicrobial Resistance, Clones, PCR, Phylogenetic Group, Public Health, Serogroup

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de queijos a partir de leite não pasteurizado é uma das formas mais antigas de utilização do leite. O queijo, por apresentar relevantes teores de lipídios, proteínas, minerais e vitaminas, é considerado um alimento completo e importante na alimentação humana.

A atividade queijeira, de importância econômica e social, é exercida por inúmeros produtores de forma artesanal, a partir de leite cru, e muitas vezes, sem os devidos cuidados higiênicos, tornando-o impróprio para o consumo. As condições de fabricação, a falta ou ineficiência do sistema de refrigeração ao longo de toda a cadeia produtiva, além de outras fontes de contaminação como baldes, bacias, peneiras, panos de prato, sal e material de embalagem, são exemplos da possibilidade de contaminação desse produto.

O queijo elaborado a partir de leite cru, de forma artesanal e sem sofrer processo de maturação, pode ser veículo de patógenos de origem alimentar, oferecendo riscos de toxi-infecções alimentares. Não se sabe corretamente a quantidade de doenças que podem ser vinculadas ao consumo de leite cru e seus derivados, porém, dentre os agentes etiológicos conhecidos está a *Escherichia coli*, que apresenta elevada prevalência nos estudos em queijos. Este micro-organismo pode ser isolado de animais saudáveis e ser potencialmente patogênico para os seres humanos, por possuir fatores de virulência característicos, podendo ser um risco potencial para a saúde pública.

O uso de antibióticos nas atividades leiteiras, principalmente no tratamento da mastite bovina, pode selecionar bactérias resistentes aos antimicrobianos nesses ambientes. Estas representam risco à saúde pública, pois pode disseminar genes de resistência em micro-organismos patogênicos aos seres humanos.

Diante do exposto, torna-se importante verificar a presença de *E. coli* potencialmente patogênica em queijos fabricados a partir de leite não pasteurizado, através da caracterização fenotípica e genotípica, além de estabelecer a relação epidemiológica entre os isolados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O leite, a produção e o consumo de queijos**

O sistema agro-industrial do leite, devido a sua enorme importância social, é um dos mais importantes do país. A atividade é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional (VILELA, et. al, 2002)

Além disso, o leite é considerado um dos alimentos mais ricos nutricionalmente devido à sua composição proteica, de vitaminas e sais minerais, podendo ser consumido na forma original ou como derivado (queijos, iogurtes, manteiga e sobremesas). Devido a essa composição química, o leite torna-se um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários micro-organismos (CHYE et. al, 2004).

O leite deve ser obtido com máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até o seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas, nutricionais (BONFOH et. al, 2003) , e conseqüentemente a qualidade de seus derivados, como o queijo. O leite pode ser contaminado quando entra em contato com a superfície do equipamento e/ou utensílios de ordenha, assim como no seu próprio tanque de refrigeração. A contagem bacteriana total do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos nos quais a limpeza e sanitização são deficientes, pois os micro-organismos proliferam nos resíduos de leite presentes em recipientes, borrachas, junções e qualquer outro local onde ocorra seu acúmulo (GUERREIRO, et. al, 2005).

O queijo, um dos derivados do leite, é um dos alimentos processados mais antigos registrados pela história da humanidade. Segundo FOX (1993), acredita-se que tenha sido originado na região entre os rios Tigre e Eufrates, no Iraque, há aproximadamente 8.000 anos, época na qual os animais começavam a ser domesticados, contribuindo significativamente para o desenvolvimento das civilizações. Historicamente, o queijo permitiu a sobrevivência de populações em períodos de fome e forneceu nutrientes vitais à boa saúde, tornando-se alimento desejável na dieta humana (KOSIKOWSKY, 1970).

Na antiguidade clássica, a Grécia e o Império Romano testemunharam a produção de queijos. A produção de queijo fresco em Roma era feita pela adição do *coagulum*, extraído do abomaso de cordeiro ou cabrito, ao leite. O leite coagulado era espremido para a retirada do soro, salpicado e deixado endurecer ao sol. Atribui-se, então, a Roma a consolidação da produção de queijos, segundo normas de qualidade e técnicas de produção, o que garantiu ao produto prestígio de alimento nobre (KOSIKOWSKY, 1970).

A produção de queijos artesanais no Brasil iniciou-se no período colonial por portugueses que traziam consigo rebanhos bovinos. Os animais tinham parte de sua escassa produção leiteira destinada à fabricação de um queijo frescal, semelhante ao da Serra da Estrela, de Portugal (RIBEIRO, 1959).

Desde 1952, o decreto 30.691 proíbe a produção dos queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado em todo território brasileiro, e torna obrigatório que recebam o carimbo e Fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Entretanto, Minas Gerais criou a lei 14.185 de 31/01/2002, regulamentando a produção do queijo minas artesanal no estado, tornando o queijo patrimônio cultural pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais, (IEPHAN). As propriedades produtoras devem ser cadastradas no Instituto Mineiro Agropecuário (IMA) e cumprir uma série de exigências como respeitar os padrões microbiológicos para alimentos da Resolução RDC nº12 de 02/01/2001, que revoga a Portaria SVS.MS 451 de 19/09/1997. A partir disso, no Brasil, a produção de queijos feitos a partir de leite cru é regular e fiscalizada apenas para algumas propriedades do Estado de Minas Gerais (BRASIL, 1952).

Mesmo com as pressões de modernização dos processos de produção, preocupação com boas práticas de fabricação e controle de qualidade que, no curso da história, forçaram a introdução da pasteurização do leite destinado à fabricação de queijos (ALEXANDRE et. al, 2002), as práticas tradicionais de fabricar o queijo com o leite cru ainda permanecem vivas e atuantes no Brasil. Com relação à produção de queijos na região do Triângulo Mineiro, verifica-se a grande quantidade de indústrias de micro e pequeno porte, com produção informal, que não seguem os parâmetros estabelecidos pela legislação, predominando a utilização de leite não pasteurizado (CARDOSO & ARAÚJO, 2004).

Em 2002 foram produzidas 31.762 toneladas de queijo Minas Frescal em todo o Brasil (BARROS, 2004). Esse queijo tem ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população das diversas regiões do país (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001; ALMEIDA FILHO, et. al, 2002; CÂMARA, et. al, 2002; CARDOSO & ARAÚJO, 2004; ROSS et. al, 2005). Devido ao grande consumo desse produto e por ser um alimento fabricado a partir de leite cru, sendo um veículo para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas, ele se torna um problema em saúde pública (ARAÚJO et. al, 2002; SCHOUTEN, et. al, 2004).

Os queijos elaborados a partir de leite cru são um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil. São macios, brancos, ligeiramente salgados, com um ligeiro sabor ácido, e produzidos pela coagulação enzimática do leite. A composição e qualidade destes queijos podem variar amplamente, dependendo do processo de fabricação (CUNHA, et. al, 2006). É importante destacar que a composição microbiológica do leite cru, o processamento e manipulação dos queijos, os equipamentos, a temperatura inadequada durante a estocagem e o transporte podem resultar em altos níveis de micro-organismos patogênicos em queijos (ARAÚJO, et. al, 2002).

## **2.2. Queijo como origem de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs)**

O interesse na qualidade dos alimentos aumentou consideravelmente, sobretudo, no que diz respeito aos riscos associados com contaminantes e metabólitos (FERNANDES & OLIVEIRA, 2006).

O queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem elaborados a partir do leite cru e por não sofrerem processos de maturação e pasteurização. A contaminação microbiológica dos produtos assume destacada relevância tanto para a indústria pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (FEITOSA et. al, 2003)

Tais micro-organismos podem comportar-se como oportunistas, considerando a resistência orgânica e as diferentes categorias de ingestores. A ingestão do alimento contaminado será muito mais grave, considerando não só a faixa etária dos

consumidores bem como possíveis ingestores subnutridos, o que os tornaria muito mais vulneráveis à microbiota patógena, potencialmente patogênica e oportunista, implicando em problemas de saúde pública (HOFFMANN, et. al, 2004).

A presença de bactérias patogênicas em alimentos é uma questão mundial para a segurança de alimentos. O risco de doenças humanas associadas à ingestão de produtos crus pode ser melhor previsto pelo monitoramento de pontos potenciais de contaminação microbiana em áreas de contato com o produto durante a coleta, o processamento, a distribuição e a comercialização nos varejos. Assim, a rápida e exata identificação de bactérias patogênicas nas amostras de alimentos é importante para garantia da qualidade do alimento e na identificação de possíveis surtos (BHAGWAT, 2003).

*Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos de micro-organismos patogênicos associados a surtos de infecções, intoxicações e toxinfecções alimentares, nos quais leite e produtos lácteos foram envolvidos (HAJDENWURCEL, 2002 #76).

Vários estudos realizados com queijo a partir de leite não pasteurizado têm permitido o isolamento de diversos sorogrupos de *Escherichia coli* (REID, 2001). A presença de bactérias termotolerantes em queijos, tais como a *E. coli*, torna-se cada vez mais preocupante, pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares (ALMEIDA & FRANCO, 2003).

Um estudo prévio feitos com 50 queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado no Meio Oeste do Brasil, detectou 96% das amostras contaminadas com *E. coli* (PANETO, et. al, 2007). Foi realizado um levantamento de alguns casos de toxinfecção alimentar de origem bacteriana no Brasil entre 1994 e 2006 (CARVALHO, 2007), e os queijos elaborados a partir de leite cru estavam envolvidos em 10% dos surtos.

Um surto de infecção envolvendo 13 pessoas no Canadá foi associada ao consumo de queijo feito a partir de leite cru (LANCE HONISH et. al, 2005) e outro surto também com queijo produzido a partir de leite cru de ovelha na França (ESPIÉ et. al, 2006), ambas causadas por *E. coli* patogênica. Outro exemplo de surto de toxinfecção alimentar com 15 indivíduos envolvendo *E. coli*, foi relatado em Pará de

Minas/MG (CERQUEIRA, et. al, 1994). Os principais sintomas relatados pelos indivíduos foram náusea, vômito, diarreia, tremores, dores abdominais e fraqueza muscular, após um período de incubação médio de 6 horas. Apenas 33,3% dos indivíduos procuraram serviço médico e 13,33% dos indivíduos foram internados por até 3 dias. O estudo relatou que a possível via de transmissão foram quatro queijos manufaturados com leite cru, contaminados por coliformes termotolerantes (*E. coli*).

### **2.3. *Escherichia coli***

Em 1855, Theodore Escherich descreveu um microrganismo que se encontrava em altas densidades nas fezes humanas o qual foi nomeado *Bacterium coli*. No início do século passado (1912), *Bacterium coli* já era utilizada como indicador da qualidade sanitária da água. Na década de 1950, esta bactéria passou a ser denominada *Escherichia coli* pelos microbiologistas e foi escolhida como modelo para estudos de processos biológicos básicos, tais como vias metabólicas, regulação gênica, transdução de sinais, estrutura de parede celular e conjugação (KUHNERT et. al, 2000).

Dentre suas principais características, destacam-se: bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás; a maioria também fermenta a lactose. Apresentam antígenos somáticos O, relacionados com os polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares (MENG, et. al, 2001).

Esta espécie compreende grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O, K e H. O antígeno O identifica o sorogrupo das cepas e a combinação de antígeno O e H identifica o sorotipo. Entretanto, nem todas as amostras apresentam os três tipos ao mesmo tempo (MENG, et. al, 2001).

Durante um estudo com queijos tipo minas frescal em Minas Gerais, verificou-se que cinco amostras (1,5%) das 330 cepas de *E. coli* analisadas apresentaram presença de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) O86, cinco amostras (1,5%) EPEC O126 e apenas duas (0,6%) EPEC O128. Os queijos com SIF apresentaram cinco amostras da característica EPEC O86, quatro amostras da EPEC O126 e uma

amostra EPEC O128. Os queijos sem SIF apresentaram apenas uma amostra EPEC O126 e uma amostra EPEC O128, no entanto nenhuma amostra suspeita de EPEC foi encontrada nas amostras de queijo temperado (OKURA, 2010). Um estudo feito com isolados de *E. coli* de diarreia infantil mostrou a presença dos sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (SILVA, et. al, 2001).

Algumas cepas podem ser identificadas pelos antígenos, porém é importante destacar que a maioria das cepas de *E. coli* é habitante natural do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo humanos, e usualmente apresentam-se como bactéria comensal. Entretanto, existem cepas de *E. coli* patogênicas que podem causar diarreia e outras doenças em humanos e animais, pois expressam fatores de virulência que estão envolvidos em sua patogênese (SANTIAGO et. al, 2005).

As cepas de *E. coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos. Se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como micro-organismo indicador, a presença de *E. coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e a possível presença de outros micro-organismos enteropatogênicos. Como micro-organismo potencialmente patogênico transmitido por alimentos, as reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novos significados em especial quando as condições do meio em que se encontram permitem sua multiplicação (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Os diferentes patótipos de *E. coli* que causam doenças em seres humanos são classicamente distribuídos em dois grupos principais, *E. coli* que causa diarreia DEC (Diarrhoeagenic *E. coli*) e *E. coli* que causa infecções extraintestinais ExPEC (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*). As infecções extraintestinais acometem o trato urinário, o sistema nervoso central, o sistema circulatório e o sistema respiratório (RUSSO & JOHNSON, 2000). As amostras de *E. coli* associadas à infecção intestinal e causadora de diarreia ou disenteria bacilar, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e são classificadas em seis classes: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas (tEPEC e aEPEC), shigatoxigênica (STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa



(EAEC), enteroinvasiva, que atualmente inclui o gênero *Shigella* (EIEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER . et. al, 2004).

A maioria das cepas de *E. coli* são consideradas comensais por se adaptarem passivamente ao seu hospedeiro sem causar doenças, sendo que na maioria dos casos são deficientes de fatores de virulência (CARDOSO, 2009; JOHNSON & RUSSO, 2002).

As cepas comensais de *E. coli* podem adquirir específicos atributos de virulência que são codificados em elementos genéticos, e tornar-se patogênicas (KAPER . et. al, 2004). Assim, a diferença de comensalismo e virulência é resultado da presença de fatores de virulência e expressão dos fatores pela bactéria. Os genes de virulência estão localizados em plasmídeos, bacteriófagos ou no cromossomo bacteriano e tem sido demonstrada a possibilidade de transferência horizontal entre distintas linhagens de *E. coli* (CARDOSO, 2009).

#### **2.4. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

*E. coli* enteropatogênica (EPEC) tem sido isolada em alimentos e na água causando doenças em seres humanos, especialmente como um importante agente de diarreia infantil em países em desenvolvimento (RAMOS, 1996; SIMANGO, 1995)

Geralmente, a transmissão ocorre por alimentos contaminados e a colonização acontece no intestino delgado onde a bactéria se fixa firmemente às células epiteliais causando lesões típicas chamadas “attaching and effacing” (A/E) (KAPER . et. al, 2004). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto celular, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal onde a bactéria permanece ligada (MOXLEY & SMITH, 2010).

A formação de lesões A/E resulta em uma redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal o que leva ao rompimento do equilíbrio eletrolítico e, posteriormente, a diarreia (CLARKE et. al, 2003). Provavelmente, a diarreia causada por EPEC resulta de múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e perda da superfície de absorção (SHAW et. al, 2005).

As cepas de EPEC são divididas em dois grupos: EPEC típicas (presença de gene *eae* e plasmídeo EAF, responsável pela aderência localizada em cultura de células epiteliais) e EPEC atípicas (presença somente do gene *eae*) (NGUYEN, et. al, 2006). A maioria das EPEC pertence aos sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O126, O127, O128, O142 e O158 (KAPER, 1996 #106). As aEPEC são muito variáveis em relação à presença dos diferentes sorogrupos.

## **2.5. *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC)**

Cepas de *E. coli* shigatoxigênica (STEC) são implicadas em casos de doenças veiculadas por alimentos, principalmente ao consumo de carne moída e leite cru. Essas cepas produzem toxinas do tipo *shiga-like* (Stx1 e Stx2) e suas variantes (MÉNARD, et. al, 2004). As cepas de STEC podem causar doenças em seres humanos como diarreia sanguinolenta (BD) e síndrome hemolítica urêmica (BYWATER et. al, 2004; KAPER, et. al, 2004).

Essas toxinas, também conhecidas como Verotoxinas, induzem um efeito citotóxico distinto e irreversível em células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano) (KONOWALCHUK, et. al, 1977). A síndrome clínica provocada por algumas cepas de STEC é caracterizada por intensas cólicas abdominais e diarreia, inicialmente aquosa, mas que evolui rapidamente para sanguinolenta, sem febre e com duração média de oito dias, sendo que, posteriormente, há um início súbito de anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda (RILEY et. al, 1983). Alguns pacientes com essa síndrome, também conhecida como síndrome hemolítica urêmica, ou SHU, podem apresentar sintomas neurológicos como letargia, fortes dores de cabeça, convulsões e encefalopatia (TESH & O'BRIAN, 1991).

O sorotipo de STEC mais frequentemente associada com SHU é O157:H7, entretanto existem mais de duzentos diferentes sorotipos de cepas de STEC alguns dos quais associados com doenças em humanos (LAW, 2000). Os seres humanos estão provavelmente mais expostos a estas cepas, uma vez que cepas não-O157 são mais prevalentes em animais e como contaminantes de alimentos, (BEAUTIN et. al, 2004; BLANCO, et. al, 2004). Cepas de STEC isoladas de humanos e de animais (causando infecções em humanos), pertencentes a um grande número de sorotipos O:H não-O157, estão associadas a um número estimado de 37 mil mortes por ano

(MORA et. al, 2005). Outros sorogrupos de STEC mais associados a doenças são O26, O103, O111, O145 (SCHMIDT, 2010).

## **2.6. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**

As ETEC são grandes causadoras de diarreia em animais de produção e em crianças, além de estarem relacionadas à diarreia dos viajantes em países em desenvolvimento (KAPER et. al, 2004; GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

Esses micro-organismos colonizam a superfície da mucosa intestinal e liberam as enterotoxinas LT (termolábil) e ST (termoestável) causando diarreia. Existem dois tipos de LT: LT-I e LT-II. A primeira é encontrada em *E. coli* patogênica tanto para humanos quanto para animais e a segunda é encontrada principalmente em isolados provenientes de animais. Entretanto, tanto em animais quanto em humanos, a enterotoxina LT-II não é associada a doenças (NATARO & KAPER, 1998). As ST são divididas em STa (bovina, suína e humana) e STb (mais associada a suínos, mas também isolada em casos esporádicos de diarreia em humanos, bezerros e aves) (GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

A patogenicidade das linhagens de ETEC é devida à habilidade da bactéria de produzir enterotoxinas e expressar adesinas de superfície, que permitem a colonização das células do epitélio intestinal (VICENTE et. al, 2005). A morbidade e mortalidade associadas aos vários surtos de doenças gastrointestinais causados por ETEC têm alertado sobre a importância desses micro-organismos na saúde pública (PATON & PATON, 1998).

Os sorogrupos de ETEC mais frequentemente associados a doenças em humanos são O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 e O173 (GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

## **2.7. *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC)**

A infecção causada por ExPEC não tem chamado a atenção como a infecção causada por *E. coli* patogênica intestinal, isto porque, em contraste com a *E. coli* O157:H7, a infecção por ExPEC não ocorre de forma epidêmica e sim de forma discreta, causa somente um leve comprometimento do hospedeiro. O órgão responsável pela saúde pública trabalha constantemente para detectar infecções

causadas por *E. coli* patogênica intestinal tornando-as notórias, enquanto que para as infecções causadas por ExPEC, não é dada a devida importância, não havendo notificação (JOHNSON & RUSSO, 2002).

Cepas de ExPEC têm sido frequentemente isoladas de produtos alimentícios, principalmente de alimentos de origem animal, indicando que os micro-organismos representam potencialmente uma classe de patógenos alimentares (SMITH, et. al, 2007). As infecções extraintestinais acometem o trato urinário, o sistema nervoso central, o sistema circulatório e o sistema respiratório (RUSSO & JOHNSON, 2000). Os patótipos de ExPEC associados a infecções de trato urinário (ITU) e meningite neonatal são conhecidos como UPEC (uropathogenic *E. coli*) e NMEC (meningitis-associated *E. coli*) respectivamente (EWERS, et. al, 2007).

*E. coli* extra intestinal (ExPEC) é uma cepa especializada, que tem como característica principal a presença de múltiplos fatores de virulência, tais como: hemolisinas, aerobactina e fímbrias. Estes fatores possibilitam a colonização da bactéria na superfície da mucosa do hospedeiro subvertendo seus mecanismos de defesa a fim de obter nutrientes essenciais, como por exemplo, o ferro facilitando a instalação da infecção. Alguns fatores estão relacionados a genes e operons, tais como pilus associado com pielonefrite (*pap*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa* I), hemaglutinina temperatura-sensível (*tsh*), aerobactina (*iuc*), e fator citotóxico necrotizante (*cnf*). Estes fatores desempenham importante papel no desenvolvimento de ITU humana (EWERS, et. al, 2007).

Alguns genes como *pap*, *sfa* e *afa* são transcritos em um único segmento de RNA mensageiro e regulados por um conjunto de sequências comuns de DNA (um operona) (BLANCO et. al, 1997).

Sorogrupos como O1, O2, O8 e O25 foram relacionados a infecções urinárias em humanos e animais ( FERREIRA & KNOBL, 2009).

## **2.8. Classificação filogenética de *E. coli***

*E. coli* pode ser classificada em 4 grupos filogenéticos diferentes. Os grupos A, B1, B2 e D. A classificação é feita de forma rápida e em larga escala, pela técnica reação em cadeia da polimerase (PCR), da combinação de três genes *chuA*

(codificador de um receptor da membrana externa), o gene *yjaA* (sem função associada conhecida) e um fragmento de DNA *tspE4.C2* (CLERMONT et. al, 2000).

Em um estudo prévio, comprovou-se que as cepas patogênicas extra intestinais (ExPEC) são, em sua maioria, oriundas dos grupos filogenéticos B2 e D. Diferentemente, as amostras comensais (sem potencial patogênico), em sua grande maioria são agrupadas em grupos filogenéticos A e B1 e as amostras patogênicas intestinais agrupam-se igualmente em A, B2 e D (SANTOS et. al, 2009).

## **2.9. Uso indiscriminado de antimicrobianos em vacas leiteiras**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso racional de antimicrobianos pode ser definido como: "aquele que maximiza os efeitos terapêuticos clínicos, enquanto minimiza tanto a toxicidade relacionada aos medicamentos, quanto o desenvolvimento da resistência antimicrobiana" (BARBOSA et. al, 2008) A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos. Algumas vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes (GALES et. al, 1997).

Um estudo no Brasil mostrou que os grupos beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais usados no tratamento para infecções em gado leiteiro, representando 38,22% do total de todos os antibióticos, seguido pelos aminoglicosídeos (25,19%) e a Tetraciclina (15,41%) (NETTO et. al, 2005).

Em uma pesquisa onde foram estudados animais (frango, suínos), carnes (de frango e suína), humanos sadios e pacientes com infecções no trato urinário (ITU) mostrou que os isolados de *E. coli* foram resistentes a Ampicilina, Estreptomicina e Tetraciclina e, a resistência daqueles provenientes de pacientes com ITU foi similar à resistência dos isolados de diferentes tipos de carne e dos isolados de animais. Os resultados indicam que os alimentos e os animais são uma fonte de patógenos resistentes para os pacientes com ITU e para a comunidade em geral (LOTTE et. al, 2010).

Os alimentos de origem animal são considerados importantes veículos de micro-organismos carreando genes de resistência e conseqüentemente pode ocorrer transferência desses genes entre os micro-organismos ali presentes (BARBOSA et. al, 2007). As indústrias de alimentos têm passado por constantes pressões dos consumidores para que sejam removidos os resíduos de antibióticos (CARVALHO, et. al, 2006).

No Estado do Paraná, Brasil, foram coletadas 260 amostras de leite de vaca pasteurizado em diferentes estabelecimentos comerciais e foi encontrado 47 isolados de *E. Coli*. Também foram detectados altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos como a Ampicilina (19,2%), Cefalotina (18,9%) e Tetraciclina (17,1%) (ZANELLA et. al, 2010).

O uso de agentes antimicrobianos nos animais é um fato que tem levado ao surgimento de micro-organismos resistentes e contribuído para a ineficácia destes produtos na prática terapêutica. Por essa razão, tornaram-se necessárias investigações do comportamento das bactérias frente aos antimicrobianos (MANTILLA, et. al, 2008; RAPINI, et. al, 2004).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser uma característica natural das várias espécies de bactérias. Podem ser adquiridas ou ainda ser cepas individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 1990). Amplas variações na sensibilidade de diferentes estirpes podem ocorrer em uma mesma espécie bacteriana aos agentes antimicrobianos. É de domínio público que os antibióticos têm sido valiosos instrumentos na luta contra os micro-organismos e doenças, porém, muitos micro-organismos adquiriram resistência aos agentes antimicrobianos e transferiram-na às gerações posteriores (GILMAN et. al, 1996).

O termo resistente se refere àqueles micro-organismos que não são inibidos pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou àqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia adequada resposta clínica quando usado como tratamento (MOTA et. al, 2005).

A resistência aos antimicrobianos está normalmente associada a um elemento extra-cromossômico ou plasmídios, os quais podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie ou mesmo de espécies diferentes. Com o uso

indiscriminado de antimicrobianos, tem ocorrido seleção de estirpes resistentes e rapidamente poderá haver uma população bacteriana resistente a determinado antimicrobiano (MENEZES et. al, 2004).

É preocupante que bactérias portando genes de resistência a antimicrobianos, patogênicas ou não patogênicas para os seres humanos, sejam isoladas na microbiota intestinal dos animais. Elas podem contaminar alimentos de origem animal, transferir sua resistência para outras bactérias da mesma espécie ou não, no intestino humano (DONNELLY, et. al, 1996; PIDDOCK, 1996; BYWATER, et. al, 2004).

Em um estudo com isolados de ExPEC provenientes de animais e humanos demonstrou-se alta prevalência de genes de resistência, sendo que, 68% dos isolados de animais apresentaram o gene *bla*<sub>TEM</sub>, 53% *tetA* e 44% *tetB* enquanto que os isolados de humanos mostraram uma prevalência de 88%, 44% e 53%, respectivamente (MAYNARD et. al, 2004). Um estudo com *E. coli* de humanos e bovinos em um ambiente de fazenda mostrou transferência de resistência a multidroga entre vacas leiteiras e os habitantes da fazenda. O plasmídeo carregou determinados genes resistentes a diversos antimicrobianos, incluindo Tetraciclina, Estreptomicina e Sulfonamida (OPPEGAARD, et. al, 2001).

O surgimento e a disseminação de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias é considerado um serio problema de saúde publica, e o controle dessa disseminação é um desafio à ciência (COHEN, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Verificar a presença de *E. coli* potencialmente patogênica através da caracterização fenotípica e genotípica de isoladas de queijos produzidos a partir de leite cru.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Isolar *E. coli* de queijos elaborados com leite cru.
- Determinar o agrupamento filogenético dos isolados de *E. coli*;
- Caracterizar os isolados de *E. coli* fenotipicamente através do teste de susceptibilidade disco-difusão;
- Identificar genes de resistência a antimicrobianos nos isolados de *E. coli*;
- Detectar o sorogrupo dos isolados de *E. coli*;
- Estabelecer relação epidemiológica das estirpes isoladas do queijo.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Introdução e origem das amostras**

Durante o estágio de graduação, em 2010, foram colhidos 83 queijos de três diferentes municípios (Figura 1): em Uberaba/Minas Gerais colheu-se 30 queijos, 22 em Ribeirão Preto/São Paulo e 31 em Aracaju/Sergipe. O município de Uberaba foi escolhido por ser uma cidade com tradição na produção de queijos artesanais, sendo que estes são patrimoniados, autorizados pelo Instituto Mineiro Agropecuário (IMA). Nesta cidade, as amostras foram colhidas de um único supermercado (Figura 2). A escolha do município de Aracaju foi devido à sua tradição com relação às feiras e vendedores ambulantes (lugar onde as amostras foram colhidas) (Figura 3), mesmo com a produção ilegal, ou seja, a proibição legal da venda desse tipo de queijo. As amostras colhidas em Ribeirão Preto foram provenientes do Mercado Municipal (Figura 4), um local mais nobre, quando comparado com as feiras e vendedores ambulantes de Aracaju, mas também com a



venda ilegal desse tipo de alimento, e por esse ser um ambiente comum em diversos municípios.

Isolou-se *E. coli* (item 4.2) e estas foram enviadas para o Laboratório de *Escherichia coli* (ECL) na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, município de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. As amostras enviadas para o Canadá, também no ano de 2010, via Fedex, foram em caixas isotérmicas, devidamente embaladas, seguindo as exigências da Associação de Transporte Aéreo Internacional (IATA), autorizadas pela Agência de Inspeção de Alimentos Canadenses, do governo do Canadá e também com autorização de exportação pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Também durante este ano, investigou-se genes de virulência (item 4.3) e como a presença desses genes de virulência não foi alta, a pesquisa deu continuidade neste projeto de mestrado, com início em Agosto de 2011, a fim de investigar melhor se os isolados provenientes de queijos feitos a partir de leite não pasteurizados poderiam ser um risco potencial à saúde pública, através de uma melhor caracterização fenotípica e genotípica dessas estirpes.



Figura 1. Parte do mapa do Brasil, visualizando os três municípios nas quais as amostras foram colhidas. (<https://maps.google.com.br/>, 2012).



Figura 2. Supermercado no município de Uberaba/MG, onde foi feita a colheita dos queijos elaborados a partir de leite cru, sendo que todos estavam refrigerados e um dos queijos colhidos, mostrando a inscrição do produtor e o cadastro no IMA. Uberaba/MG, 2010.





Figura 3. Estabelecimentos, feiras e vendedores ambulantes onde foram feitas as colheitas de queijos elaborados a partir de leite cru em Aracaju/SE, mostrando a forma como eles estavam mantidos, sem refrigeração e a situação dos queijos, com grande quantidade de olhaduras. Aracaju/SE, 2010.



Figura 4. Mercado Municipal de Ribeirão Preto/SP, lugar em que foi feita a colheita de queijos elaborados a partir de leite cru, mostrando que os queijos não ficavam sob refrigeração e muitas vezes sem embalagens. Ribeirão Preto/SP, 2010.

#### 4.2. Isolamento de *E. coli*

Os queijos colhidos foram mantidos em caixas isotérmicas com gelo reciclável até a chegada no laboratório (intervalo de tempo de 2-8 h). Foram transferidos 25 g de cada amostra colhida para sacos plásticos esterilizados contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada (Merck Laboratories, Alemanha). O conteúdo foi homogeneizado durante 1 min, obtendo-se assim a diluição  $10^{-1}$ . A partir dessa solução homogeneizada foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-3}$  para análise (APHA, 2001).

Cada diluição foi semeada em um tubo contendo caldo *Escherichia coli* (Merck Laboratories, Alemanha) e incubada no banho-maria a 44,5°C por 24 h. A mesma diluição também foi inoculada em outro tubo contendo caldo bile verde brilhante (Merck Laboratories, Alemanha), incubada a 37°C por 24 a 48 horas.



Amostras positivas para coliformes termotolerantes e totais (produção de gás) foram inoculadas em placas com ágar Eosina Azul de Metileno (ou EMB, Merck Laboratories, Alemanha) e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As colônias que apresentaram coloração verde metálico foram consideradas sugestivas de *E. coli* (Figura 5) (APHA, 2001).

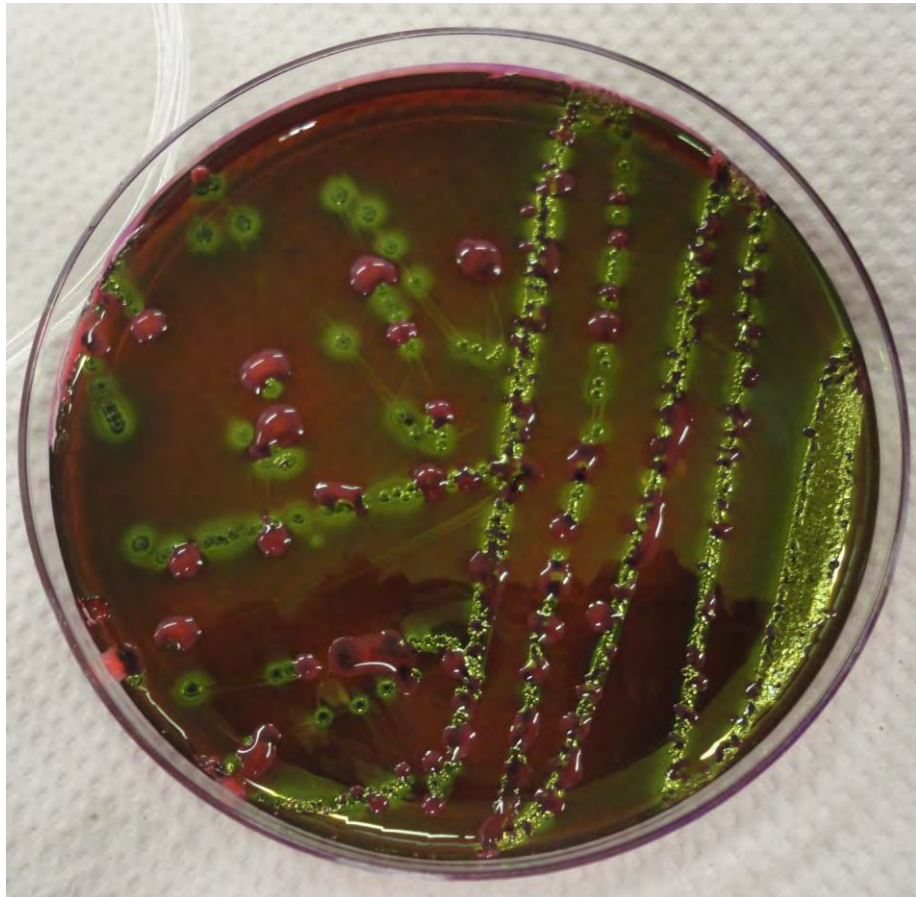


Figura 5. Placa de EMB com colônias verde brilhantes, características de *E. coli*. Jaboticabal/SP,2010.

Em seguida, 3 a 5 colônias sugestivas de *E. coli*, de cada placa de EMB (Merck Laboratories, Alemanha), foram semeadas em ágar TSA (triptona de soja, Merck Laboratories, Alemanha) inclinado e incubadas a 37° C por 24 a 48 h. As amostras consideradas *E. coli* e identificadas pelos testes bioquímicos (Figura 6): Indol positivo (KONEMAN et. al, 2001), prova do vermelho de metila (VM) positiva (SIQUEIRA, 1995), prova de Voges-Proskauer (VP) negativa (KONEMAN et. al, 2001) e prova da utilização do citrato negativa (SIQUEIRA, 1995), características de

*E. coli* foram mantidas em ágar TSA (Merck Laboratories, Alemanha) na geladeira à 4°C e, então enviadas para o Laboratório de *Escherichia coli* na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, município de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá.

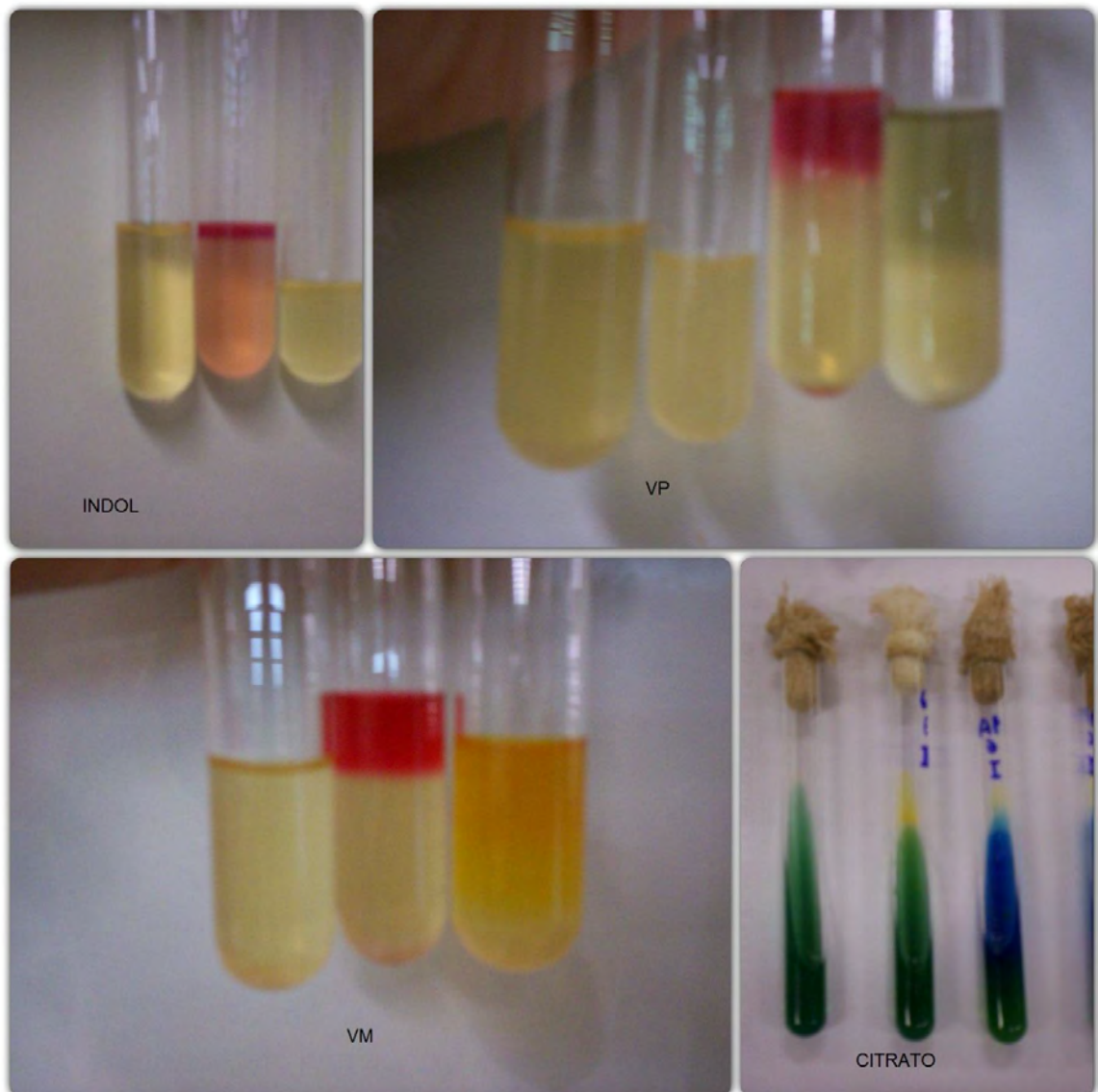


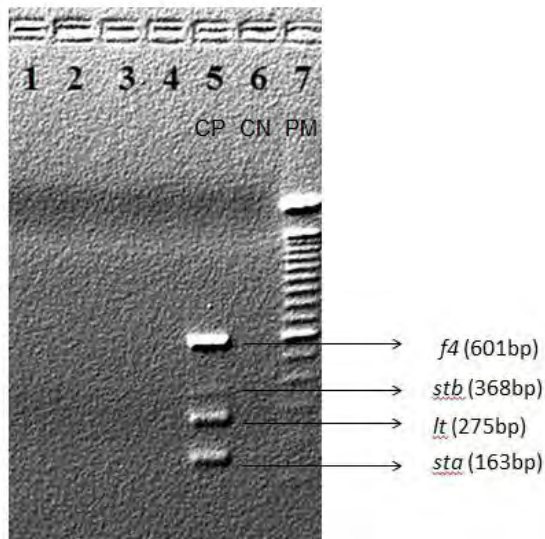
Figura 6. Testes bioquímicos feitos para a identificação de *E. coli*. Indol positivo (coloração vermelha permanente e formação de anel vermelho na superfície do meio), VM positiva (formação de anel vermelho na superfície do meio), VP negativa (coloração da superfície amarelo/esverdeada) e citrato negativo (ágar continua verde). JaboticabaL/SP, 2010.

### 4.3. Pesquisa de genes de virulência

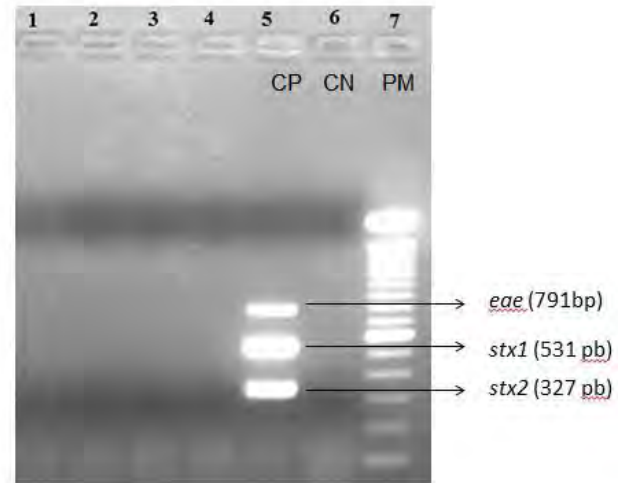
Estudos preliminares realizados no ano de 2010, durante o estágio de graduação, isolou-se 169 isolados, sendo 51 de Uberaba, 25 de Ribeirão Preto e 93 de Aracaju e investigou-se genes de virulência para EPEC (*eae*), STEC (*stx1*, *stx2*), ETEC (*sta*, *stb*, *lt*, *f4*), e ExPEC (*tsh*, *iucD*, *papC*, *cnf*) para todos os isolados de *E. coli* (Figura 7). Dos 169 isolados, 17 (10,6%) apresentaram genes para ExPEC, sendo que os isolados eram de Uberaba (4/7, 84%) e Aracajú (13/13, 97%). Não foram encontrados genes para STEC, EPEC e ETEC.

Devido à baixa prevalência dos genes de virulência nos isolados, deu-se continuidade à pesquisa a fim de investigar melhor se estes isolados poderiam ser um risco potencial à saúde pública, através de uma melhor caracterização fenotípica e genotípica dessas estirpes, através do agrupamento filogenético, teste de susceptibilidade disco-difusão, investigação de genes de resistência, detecção de sorogrupo, campo pulsado, que serão descritos a partir de agora.

## EPEC



## STEC and EPEC



## ExPEC

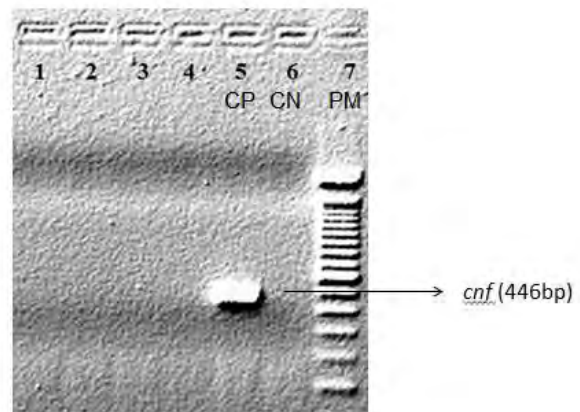
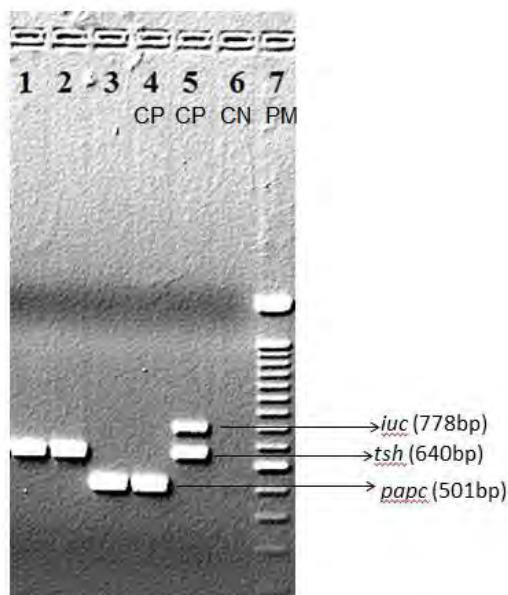


Figura 7. Eletroforese dos produtos de amplificação por PCR para a detecção dos genes para EPEC (*f4*, *stb*, *lt*, *sta*), STEC e EPEC (*stx1*, *stx2*, *eae*) e ExPEC (*iuc*, *tsh*, *papc*, *cnf*) de isolados de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado dos estudos preliminares. Poço 5 – controle positivo (CP, ou seja, utilização de DNA de isolado positivo para o gene investigado), poço 6 – controle negativo (CN, ou seja, utilização de água Milli-Q estéril e filtrada) e poço 7 – marcador molecular de peso molecular conhecido (PB, 100 pb DNA Ladder - Invitrogen®). Saint-Hyacinthe/QC, Canadá, 2010.



#### **4.4. Preparação do DNA template das cepas identificadas como *E.coli***

O DNA microbiano foi obtido segundo a técnica proposta pelo Laboratório de *Escherichia coli* (ECL) da Universidade de Montreal, Canadá, cujo protocolo encontra-se em [http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC\\_PCR\\_en.aspx](http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx) (Anexo 1). Cada colônia de *E. coli* em ágar TSA (ágar triptona de soja, Hymedia, India) foi semeada em um tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo Luria Bertani (ou LB, Hymedia, India), e incubada na estufa a 37° C por 18 h. Em seguida, a cultura foi transferida para um microtubo e centrifugada a 17226 g (12.000 rpm) por 2 min para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 1000 µL de PBS (tampão fosfato salino) estéril e agitadas em vórtex até completa diluição do precipitado. A cultura bacteriana foi novamente precipitada e foi descartado o sobrenadante conforme descrito anteriormente. Em seguida, 500 µL de água ultrapura (Milli-Q) estéril foi adicionada e o tubo foi agitado em vórtex até dissolver o precipitado. O microtubo contendo a cultura foi colocado por 10 min em água fervente. Após esse período, as células foram precipitadas por centrifugação a 17226 g (12000 rpm) durante 2 min e uma alíquota de 400 µL foi retirada do sobrenadante e transferida para outro microtubo. Esse material foi estocado em freezer a -20° C e mantido até o momento de uso (KESKIMAKI, et. al, 2001).

#### **4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para agrupamento filogenético**

O agrupamento filogenético foi feito para todos os 169 isolados de *E. coli*. A identificação dos genes *chua*, *yjaa* e *tspe4c2* foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores seguindo árvore dicotômica (Figura 8) (CLERMONT, et. al, 2000).

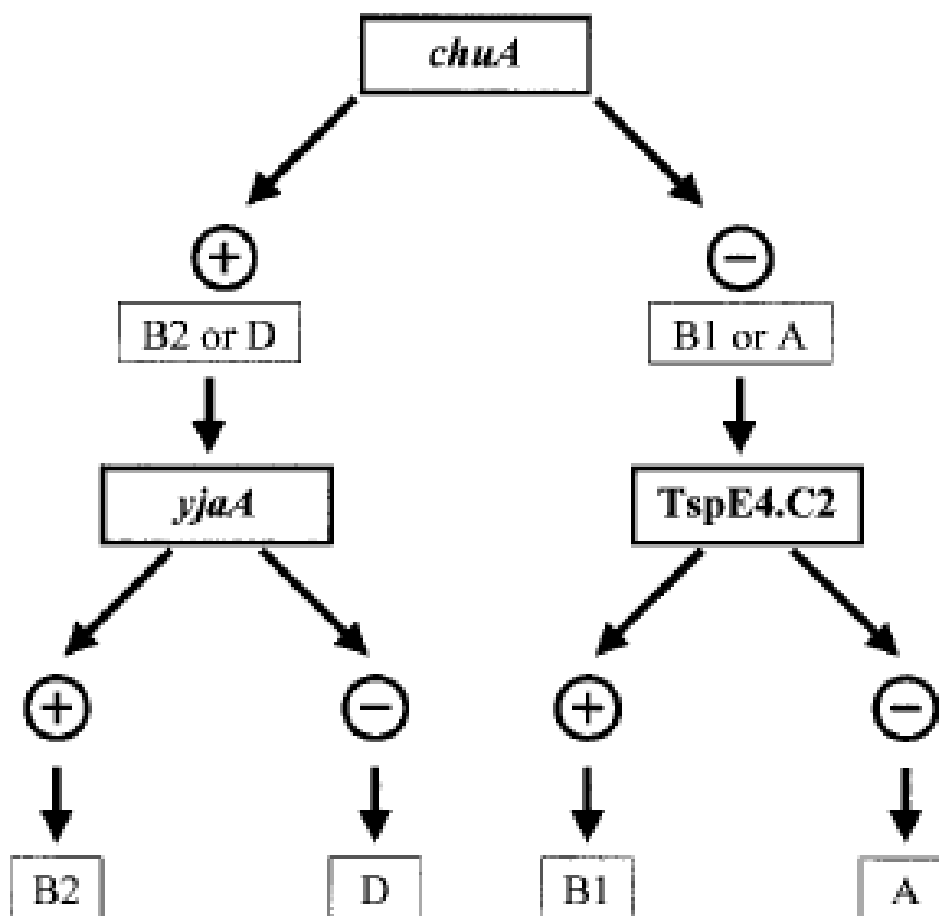


Figura 8. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético cepa de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chua*, *yjaA* e *tspe4* (CLERMONT, et. al, 2000).

Para tal, cada reação de amplificação foi conduzida em volumes de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 5  $\mu\text{L}$  de DNA molde; 2,5 mL de solução de dNTPs (2 mM cada); 1,25  $\mu\text{L}$  de cada iniciador a 10  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA polimerase (5U /  $\mu\text{L}$ ); 2,5  $\mu\text{L}$  de solução tampão para a reação de PCR com  $\text{MgCl}_2$  (10X) e 7,3  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q) previamente esterilizada.

Essa mistura foi submetida a um termociclador a 94°C por 5 min (desnaturação); seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturação), 55°C por 30 s (pareamento) e 72 °C por 30 s (extensão). O último ciclo foi realizado a 72 °C por 10 minutos para completa extensão. Uma alíquota desta reação contendo apenas água Milli-Q estéril, sem DNA, foi usada como controle negativo e para controle positivo foi usado a cepa EcL2015. Os produtos amplificados foram visualizados por

eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA gel Strain (Invitrogen) e visualizado com Blue-Light Transilluminator. Foi usado como referência um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

A sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes *ChuA*, *YjaA* e *TspE4C2*, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA *tspE4c2*, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento.

Iniciador	Sequência do Oligonucleotídeo iniciador (5'-3')	Produto de amplificação	Temperatura de pareamento
<i>chua for</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	55 °C
<i>chua rev</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaa for</i>	TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG	211	
<i>yjaa rev</i>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>tspE4c2 for</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	
<i>tspE4c2 ver</i>	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

#### 4.6. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência

Para a realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos, foram selecionados 95 isolados, alguns positivos para genes de virulência (17) e alguns aleatoriamente (78), e estes foram repicados em placas de ágar sangue e mantidos por 24 h a 37°C.

Foi colhida uma alíquota do isolado com uma alça estéril, a qual foi mergulhada em um tubo contendo 10 mL de água ultrapura estéril. Em seguida, o tubo foi agitado (vórtex) e a turbidez foi ajustada até atingir a escala 0,5 de MacFarland. A seguir, as culturas foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Merck Laboratories, Alemanha) e, após 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados os discos impregnados com antimicrobianos (Becton, Dickinson and Company - BD, EUA). A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C por meio da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os halos foram comparados com os intervalos estabelecidos pelo CLSI (CLINICAL AND

LABORATORY STANDARD INSTITUTE 2007), exceto para o ceftiofur, para o qual foi utilizada outra referência do CLSI (2008).

Os antimicrobianos testados foram recomendados pela agência de saúde pública do Canadá (PHAC): Amicacina (30 $\mu$ g), Amoxicilina/Ácido clavulônico (20/10 $\mu$ g), Ampicilina (10 $\mu$ g), Cefoxitina (30 $\mu$ g), Ceftriaxona (30 $\mu$ g), Cloranfenicol (30 $\mu$ g), Ciprofloxacina (5 $\mu$ g), Gentamicina (10 $\mu$ g), Canamicina (30 $\mu$ g), Ácido nalidíxico (30 $\mu$ g), Streptomicina (10 $\mu$ g), Sulfisoxazole (250 $\mu$ g), Tetraciclina (30 $\mu$ g), sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25  $\mu$ g)), Ceftiofur (30 $\mu$ g).

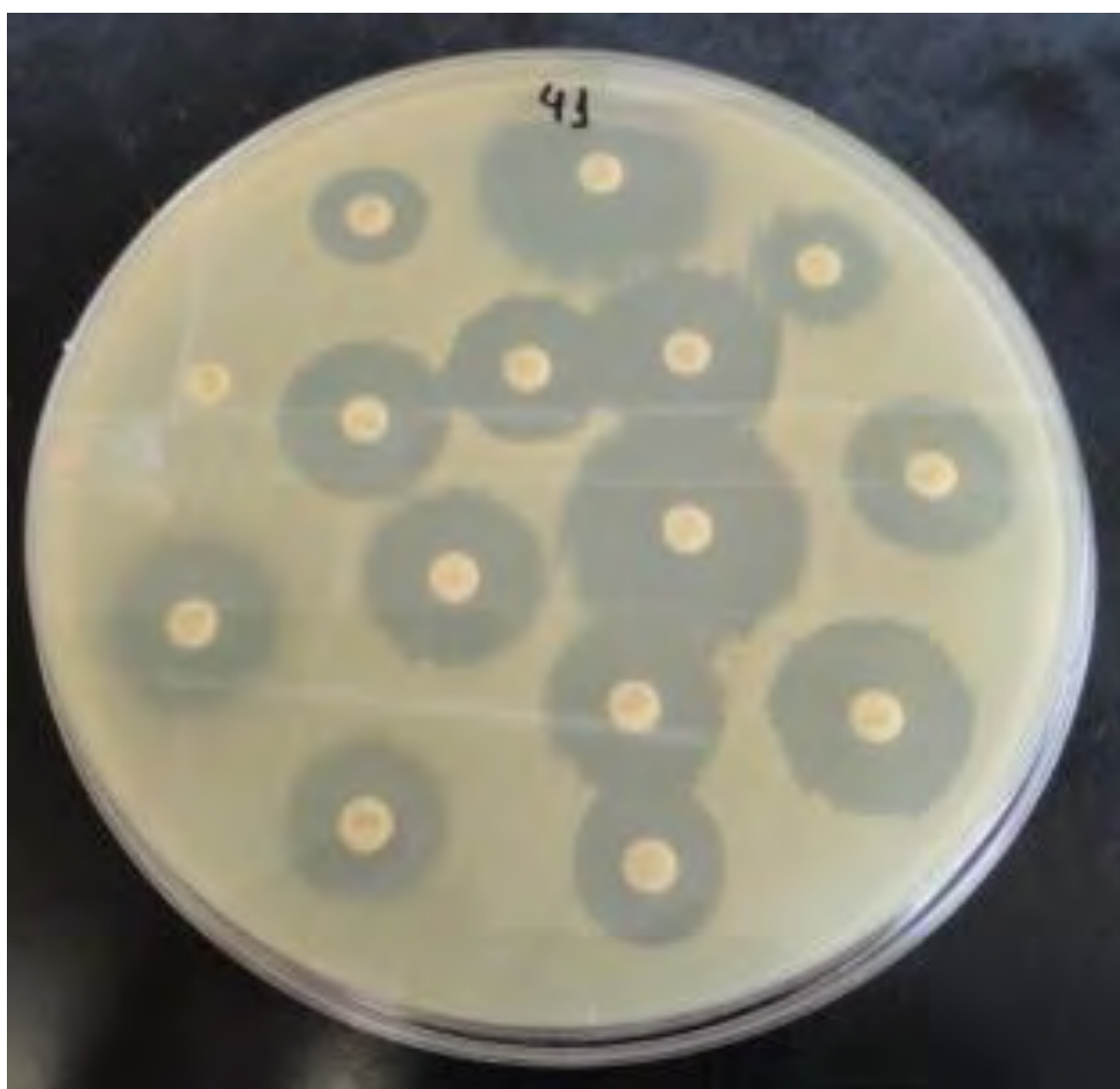


Figura 9. Placa de ágar Mueller-Hinton pronta para leitura dos halos de inibição. Saint-Hyacinthe, QC, Canadá, 2012.

#### 4.7. Análise molecular para identificação de genes de resistência através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção do gene de resistência foi realizada para 52 isolados (aqueles positivos para genes de virulência, resistentes a um ou mais antimicrobianos e ainda alguns aleatoriamente), sendo que, foram analisados os genes para a Estreptomicina (*aadA1* – MAYNARD et. al, 2003), a Tetraciclina (*tetA* e *tetB* – MAYNARD et. al, 2003), a Ceftriaxona (*blaCmy* – ZHAO, et. al, 2001) e a Penicilina (*blaTem* – MAYNARD et. al, 2003), sendo que os dois últimos genes foram detectados por PCR multiplex.

Para tal, cada reação de amplificação foi conduzida em volumes de 25  $\mu$ L contendo: 5  $\mu$ L de DNA molde; 2,5 mL de solução de dNTPs (2 mM cada); 1.25  $\mu$ L de cada iniciador a 10  $\mu$ M ; 0,2  $\mu$ L da enzima Taq DNA polimerase (5U/ $\mu$ L) ; 2,5  $\mu$ L de solução tampão para a reação de PCR com MgCl<sub>2</sub> (10X) e o restante, até completar 25  $\mu$ L, de água ultra-pura (Milli-Q) previamente esterilizada.

Essa mistura foi submetida a um termociclador a 95°C por 2 min (desnaturação); seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturação), temperatura de pareamento (específica para cada oligonucleotídeo iniciador) por 30 s (pareamento) e 72 °C por 30 s (extensão). O último ciclo foi realizado a 72 °C por 10 minutos para completa extensão. Uma alíquota desta reação contendo apenas água Milli-Q estéril, sem DNA, foi usada como controle negativo. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA gel Strain (Invitrogen) e visualizado com Blue-Light Transilluminator. Foi usado como referência um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen) (Figura 10).

A sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes *aadA1*, *tetA*, *tetB*, *blaCmy*, *blaTem*, controles positivos usados, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes *aadA1*, *tetA*, *tetB*, *blaCmy*, *blaTem*, controles positivos usados, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento.

Iniciador	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	Controle positivo	Produto de amplificação	Temp. de pareamento
<i>aadA1 For</i>	CATCATGAGGGAAGCGGTG	EcL 3482	786	50°C
<i>aadA1 Rev</i>	GACTACCTTGGTGATCTCG			
<i>tetA For</i>	GTGAAACCCAACATACCCC	EcL 3482	888	55°C
<i>tetA Rev</i>	GAAGGCAAGCAGGATGTAG			
<i>teB For</i>	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	EcL 12572	774	50°C
<i>tetB Rev</i>	ACTGCCGTTTTTTCGCC			
<i>blaCmy For</i>	GACAGCCTCTTTCTCCACA	EcL3482	1000	50°C
<i>blaCmy Rev</i>	TGGAACGAAGGCTACGTA			
<i>blaTem For</i>	GAGTATTCAACATTTTCGT	EcL 3482	857	
<i>BlaTem Rev</i>	ACCAATGCTTAATCAGTGA			

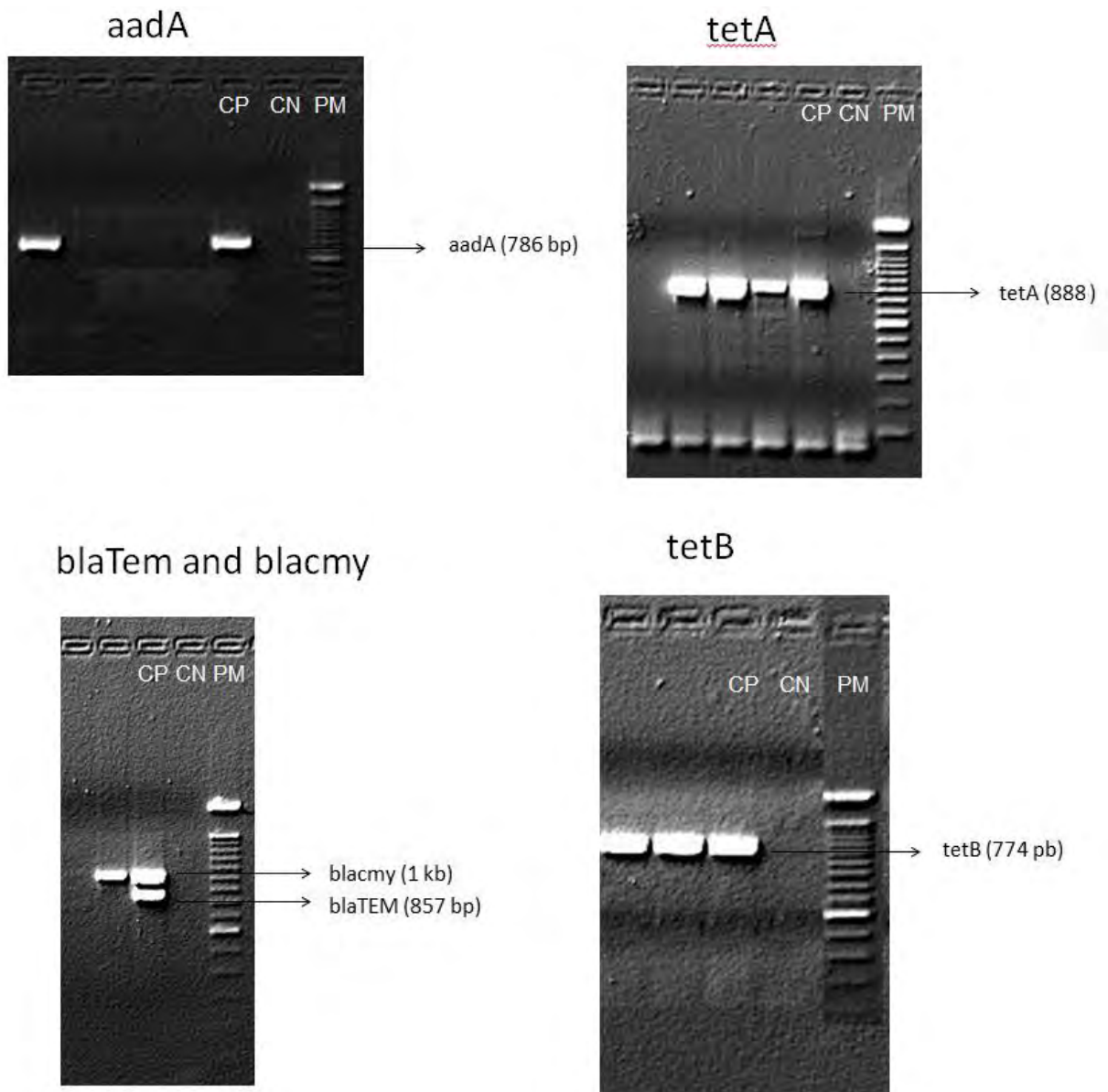


Figura 10. Eletroforese de produtos de amplificação por PCR para a detecção dos genes de resistência *aadA1*, *tetA*, *tetB*, *blaCmy* e *blaTem* de isolados de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado. CP (controle positivo - utilização de DNA de isolado positivo para o gene investigado), CN (controle negativo - utilização de água Milli-Q estéril e filtrada) e PM (marcador molecular de peso molecular conhecido - PB,100 pb DNA Ladder - Invitrogen®). Saint-Hyacinthe/QC, Canadá, 2012.

#### 4.8. Sorologia para detecção do antígeno somático (O)

Para detecção do antígeno somático (O), foram selecionadas 52 isolados incluindo aqueles positivos para genes de virulência, resistentes a um ou mais antimicrobianos e ainda alguns aleatoriamente.

Inicialmente as cepas foram repicadas em placas contendo TSA e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, uma alçada da cultura foi transferida do TSA para um tubo contendo 1 mL de PBS estéril. Os tubos foram levados para autoclave por 2 horas a 121°C para a eliminação da cápsula e liberação do lipopolissacarídeo (LPS). Em seguida, uma gota da suspensão bacteriana autoclavada e uma gota de cada anti-soro foram colocados em uma lâmina (ORSKOV, et. al, 1977). A presença de aglutinação, verificada em aglutinoscópio, foi considerada como resultado positivo (Figura 11).

Foram utilizados 17 pools de anti-soros polivalentes, visualizados na tabela 3 a seguir, fornecidos pelo Laboratório de *Escherichia coli* (EcL), da Universidade de Montreal, Canadá. As amostras que foram positivas para o soro polivalente foram retestadas com os soros monovalentes.

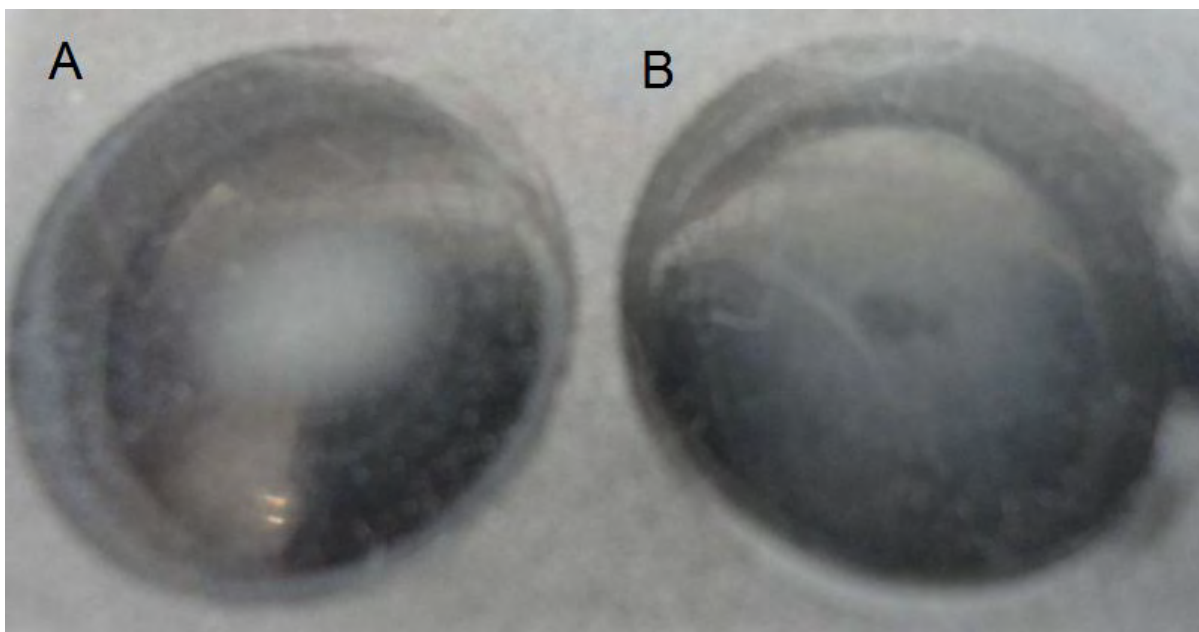


Figura 11. A - reação positiva (aglutinação) e B – reação negativa para detecção do antígeno somático (O) de isolados de *E. coli* provenientes de queijos elaborados a partir de leite cru. Saint-Hyacinthe, QC, Canadá, 2012.



Tabela 3. Pools de anti-soros polivalentes e seus respectivos anti-soros monovalentes que foram utilizados para detecção do antígeno somático (O).

Pool	Anti-soros
1	O8, O9, O20, O26, O64, O101, O141
2	O45, O138, O139, O147, O149, O157
3	O10, O108, O115, O119
1S	O1, O15, O21, O71, O83
2S	O2, O11, O18, O69, O131
3S	O4, O6, O22, O78, O137
4S	O53, O54, O55
5S	O35, O60, O73, O86
6S	O23, O34, O88, O111, O112, O120, O143
7S	O17, O49, O100, O117, O118, O123, O163
8S	O5, O27, O36, O76, O92
9S	O145, O148, O159, O173
10S	O46, O82, O84, O91, O98, O113
11S	O116, O121, O126, O146, O171, O172
HUMANO	O25, O114, O125, 0
COELHO 1	O7, O16, O75, O103
COELHO 2	O109, O128, O132, O153

#### 4.9. Análise epidemiológica das cepas por gel de eletroforese de campo pulsado (PFGE)

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) foi realizado para os 52 isolados (incluindo aqueles positivos para genes de virulência, resistentes a um ou mais antimicrobianos e ainda alguns aleatoriamente, ou seja, foram os mesmo isolados q foram realizadas as técnicas de detecção de genes de resistência e também sorologia). A PFGE foi realizada de acordo com o “The National Molecular Subtyping Network for Food Disease Surveillance (Junho 2004) (RIBOT, et. al, 2006) em um CHEF DR III sys et. al, 2006) tem a 14 °C em 0.5 x TBE. A preparação dos “plugs” e digestão do DNA genômico com *Xba*I (Invitrogen, EUA) foi feita de acordo com o protocolo utilizado no “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)”. As condições de eletroforese foram: tempo inicial de 2,2 segundo, tempo final de 54,2 segundos em um gradiente de 6 V cm<sup>-1</sup> e um ângulo de 120°. Os géis foram submetidos a eletroforese por 18h. A similaridade dos fragmentos (Figura 12) foi comparada utilizando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização e o dendrograma foi construído com o método de agrupamento UPGMA, utilizando-se o programa BioNumerics. Os “clusters” foram estabelecidos pelo valor de “cut off” do BioNumerics versão 5.0.

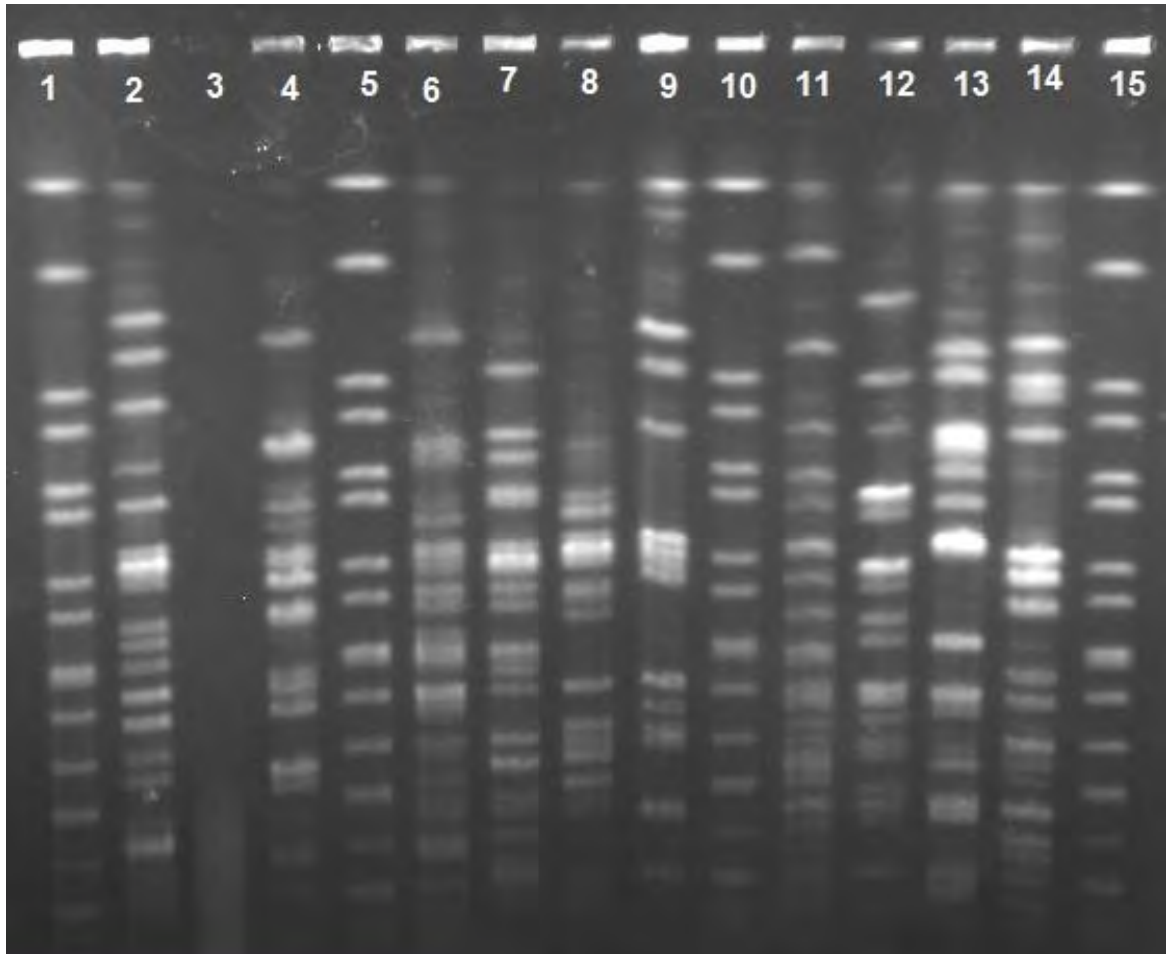


Figura 12. Eletroforese de campo pulsado de *E. coli* isoladas de queijos elaborados de leite não pasteurizado. Nos poços 1, 5, 10 e 15 observa-se o padrão de DNA de *Salmonella* sorovar Braenderup H9812 digerido com enzima XbaI.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. A prevalência de *E. coli* em queijos elaborados a partir de leite cru foi maior em Aracaju/SE.

Das 83 amostras colhidas dos três municípios, obteve-se um total de 169 isolados de *E. coli*: 51 dos queijos da região de Uberaba/MG, 25 do mercado municipal de Ribeirão Preto/SP e 93 de vendedores ambulantes de Aracaju/SE. A prevalência de amostras positivas para *E. coli* foi maior nos queijos provenientes de Aracaju (90,3%) e isso pode ser melhor visualizado na Tabela 4.

Tabela 4. Número de amostras positivas para *E.coli* nos três diferentes municípios do Brasil, de acordo com a quantidade de queijos colhidos de cada município.

	Cidade			Total
	Uberaba/MG	Ribeirão Preto/SP	Aracaju/SE	
Nº de amostras positivas para <i>E. coli</i>	13/30(43,33%)	11/22(50,0%)	28/31(90,32%)	52/83(62,65%)

A maior contaminação nos queijos de Aracaju provavelmente se deve porque esta região é uma região de fazendas menores, pessoas mais simples e conseqüentemente, manipuladores não capacitados para esse tipo de produção. Estas pessoas não entendem a importância da higiene adequada desde a ordenha, até o produto final, incluindo até mesmo os utensílios para a produção do queijo, como, por exemplo, os moldes, colocando em risco a saúde pública. Entendendo essa importância, as pessoas são capazes de produzir um alimento mais seguro, sem risco potencial para a população.

O número de amostras positivas para *E. coli* foi alto nas 3 cidades estudadas, assim como em um estudo em 31 queijos com o mesmo tipo de produção em Campinas, São Paulo, Brasil, mostrou que 64,5% dos queijos estavam contaminados com *E. coli* (CARVALHO, et. al, 2007). Em outro estudo, também com queijos feitos a partir de leite não pasteurizado no Meio Oeste do Brasil, o isolamento da espécie *E. coli* foi alta (96% do total de 50 queijos testados) (PANETO, et. al, 2007). Também, no Estado de Goiás, Brasil, 24 queijos também elaborados a partir de leite cru foram analisados e 17 (70,8%) foram positivos para *E. coli* (CAMPOS, et. al, 2009). Outros países parecem ter o mesmo problema, como na Malásia, onde 930 amostras de leite testadas, aproximadamente 65% estavam contaminadas com *E. coli* (CHYE, et. al, 2004).

*E. coli* pode causar diversas doenças de variadas severidade em seres humanos. Embora não haja uma ligação direta entre infecções do úbere com *E. coli* e doenças em humanos, uma grande variedade de sorotipos tem sido isolados do leite e é provável que alguns desses sejam patogênicos para os humanos (BAYLIS, 2009). A presença desses micro-organismos demonstra que está havendo uma falha na higiene ou manipulação incorreta durante o processo de produção do queijo, que vai desde a ordenha até a mesa do consumidor.

Em contrapartida, um estudo com produção de queijos a partir de leite cru no Brasil detectou apenas 17 positivos para *E. coli* (10,3%) de todos os 165 queijos

examinados (SOBRINHO, et. al, 2012) e em uma fazenda irlandesa de produção de queijo *E. coli* foi ausente ou presente em baixos números em 351 queijos testados (O'BRIEN, 2009). Os autores irlandeses sugeriram que a produção nas fazendas tem melhorado com relação à higiene na manipulação e equipamentos, e no controle da cadeia de frio desde a estocagem até o transporte. Portanto, comprova-se que a qualidade microbiológica do queijo melhora com a higiene do processo de produção e, isso reforça a importância da conscientização desses produtores com relação à manipulação desde a ordenha até o produto final, principalmente os produtores de Aracaju

Com isso, comprova-se que quando se há uma preocupação com relação à higiene, durante todo o processo de produção de queijos, diminui-se a chance de contaminação, e conseqüente diminuição da carga microbiana, diminuindo-se também o risco desse tipo de alimento atuar como veículo de agentes.

## 5.2. A maioria dos isolados de *E. coli* em queijos produzidos a partir de leite cru pertencem aos grupos filogenéticos A e B1.

A maioria dos isolados pertenceu ao grupo filogenético A (54,4%). Em Uberaba e Ribeirão Preto o grupo filogenético mais comum foi o B1 (80,4% e 64% respectivamente) e em Aracaju foi o grupo A (78,5%). Isolados pertencentes ao grupo B2 e D foram encontrados somente nos isolados de Aracaju, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Número total de isolados de *E. coli* de queijos elaborados a partir de leite cru em cada grupo filogenético nos três diferentes municípios no Brasil.

Cidade	Nº total de isolados	No. (%) de isolados do grupo filogenético			
		A	B1	B2	D
Uberaba	51	10 (19,6)	41 (80,4)	0	0
Ribeirão Preto	25	9 (36)	16 (64)	0	0
Aracaju	93	73 (78,5)	18 (19,3)	1 (1,1)	1 (1,1)
Total	169	92 (54,4)	75 (44,3)	1 (0,65)	1 (0,65)

Em um estudo no Brasil, envolvendo isolados de septicemia (24), síndrome da cabeça inchada (14), onfalite (11) e isolados comensais (30) em frangos, verificou-se que amostras comensais e de onfalite eram predominantemente do grupo filogenético A (Neste trabalho também houve a predominância do grupo

filogenético A nos isolados de Aracaju), e os isolados de septicemia eram dos grupos A e D. Os autores do referido estudo afirmaram que cepas *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) podem ser fonte de genes de virulência para humanos e representar um risco zoonótico (CAMPOS et. al, 2008).

Um estudo realizado, em frigorífico suíno, com 74 animais, não foi encontrado tantos fatores de virulência e os isolados pertenceram principalmente ao grupo B1, seguido pelo A, o que também ocorreu nos isolados de Uberaba e Ribeirão Preto. Os autores afirmaram que o estudo filogenético é uma grande ferramenta para programas de vigilância para *E. coli* em matadouros (MARTINS et. al, 2012).

Outro estudo em aves apresentou isolamento de *E. coli*, sendo a maioria dos grupos filogenéticos A e B1 e a minoria dos grupos B2 e D. De 80 isolados contendo fatores de virulência, 24 eram do grupo A, 23 do grupo D, 17 do B1 e 16 do B2 e os autores acreditam que a carne de frango deve ser bem cozida e que a manipulação deve ser adequada para não haver contaminação cruzada em outros alimentos prontos (OBENG, et. al, 2012). Considerando haver os estudos supracitados, pode-se afirmar que existem isolados dos grupos A e B1, considerados comensais para alguns autores, porém que podem causar doenças, podendo ser fonte de genes de virulência e apresentar risco zoonótico.

Um estudo na Dinamarca com isolados de *E. coli* de pessoas com infecções no trato urinário (ITU), pessoas saudas, carne de frango local e importada, frangos de corte, carne de suínos local e importada, mostrou a presença dos grupos B2 e D em isolados de pacientes com ITU e o grupo A foi predominantemente encontrado nos animais e na carne. Conclui-se, então, que estes podem ser fontes de *E. coli* e apresentar um risco para aquisição de *E. coli* patogênicas para o trato urinário (JAKOBSEN, et. al, 2010).

Isolados de STEC no Estado de São Paulo, Brasil, provenientes de infecções em humanos e de fezes de bovinos, foram classificadas principalmente como do grupo filogenético B1 (CERGOLE-NOVELLA, et. al, 2011). Para alguns autores, amostras comensais são normalmente do grupo filogenético A e B1, amostras patogênicas intestinais agrupam-se em A, B2 e D, enquanto as extra intestinais são oriundas dos grupos B2 e D (SANTOS et. al, 2009).

Neste estudo demonstrou-se que nem sempre cepas patogênicas extra-intestinais são do grupo B2 e D, sendo importante destacar que cepas potencialmente patogênicas também podem pertencer aos grupos A e B1, dependendo do seu fator de virulência e também do seu sorogrupo. Portanto, apesar de o grupo filogenético ser importante para programas de vigilância e epidemiologia, ele não determina a patogenicidade do isolado, sendo importante realizar outras análises.

### **5.3. A resistência aos antimicrobianos foi moderada nas três cidades e *tetB* foi o gene mais comumente encontrado.**

O maior número de isolados com resistência antimicrobiana (uma classe de antimicrobiano ou mais) foi observado em isolados provenientes de Uberaba (17/30, ou seja, 56,7%). A maioria dos isolados (27/61) foi resistente a um e dois antimicrobianos. A resistência a múltiplas drogas (resistente a três ou mais classes de agentes antimicrobianos) foi muito maior em isolados de Uberaba e Ribeirão Preto (12 e 14%) do que aqueles isolados de Aracaju (2%). Houve alta prevalência de resistência à Tetraciclina em Uberaba e Ribeirão Preto (de 23,3% e 37,5%). Convém ressaltar que a prevalência de isolados resistentes para Ampicilina e Amoxicilina / Ácido Clavulânico foi muito maior em Uberaba do que em Ribeirão Preto e Aracaju. Todos os 95 isolados foram susceptíveis à Ceftriaxona, Amikacin, Gentamicina e Cloranfenicol (Tabela 6).

Tabela 6. Resistência antimicrobiana em isolados *E. coli* de queijos produzidos a partir de leite cru em três diferentes cidades no Brasil baseado no método de disco - difusão.

Cidade	N° De isolados	N° de isolados pelo No. De classes de antimicrobianos						N° de isolados resistentes por classe de antimicrobiano e antimicrobiano											
		0	1-2	3-4	5-6	GEN <sup>b</sup>	KAN <sup>b</sup>	STR <sup>b</sup>	AMP <sup>b</sup>	AMC	CRO <sup>b</sup>	FOX <sup>b</sup>	TIO <sup>b</sup>	FIS <sup>b</sup>	SXT <sup>b</sup>	CHL <sup>b</sup>	CIP <sup>b</sup>	NAL <sup>b</sup>	TET <sup>b</sup>
						Aminoglicosídeos <sup>a</sup>			β-lactâmicos <sup>a</sup>			Sulfonamidas <sup>a</sup>		Fenicóis <sup>a</sup>	Quinolonas <sup>a</sup>	Tetraciclínas <sup>a</sup>			
Uberaba	30	13	13	3	1	0	2	3	8	9	0	2	0	1	1	0	0	2	7
R. Preto	16	10	4	2	0	0	0	1	3	2	0	0	1	1	0	0	0	0	6
Aracaju	49	38	10	0	1	0	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	1	1	6
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>61</b>	<b>27</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>19</b>

<sup>a</sup> Diferentes classes de antimicrobianos

<sup>b</sup> Antimicrobianos, Abreviações de antimicrobianos que foram usados no estudo são: Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC), Ceftiofur (TIO), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Amikacin (AMK), Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Gentamicina (GEN), canamicina, Ácido Nalidixico, Streptomina (STR), Trimetoprim-Sulfametoxazole (SXT), Ioramf enicol (CHL), Sulfisoxazole (FIS), Tetraciclina (TET).

A resistência a antimicrobianos em isolados de *E. coli* de humanos, animais e do meio ambiente é uma preocupação em saúde pública, principalmente porque a frequência de resistência a antimicrobianos vem crescendo cada vez mais em todo o mundo. Um exemplo disso foi um estudo com isolados de alimentos e fezes de animais na Alemanha onde a resistência pôde ser detectada para Ampicilina (5% resistente ou intermediário), Cefalotina (78%), Tetraciclina (27%) e Cloranfenicol (8%, apenas resistentes intermediários) (KLEIN & BULTE, 2003).

A moderada percentagem deste estudo com isolados de *E. coli* provenientes de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado reflete o provável uso baixo a moderado de antimicrobianos, e isso pode ser explicado pois estes tipos de queijos são, em sua maioria, produzidos em propriedades que tendem a ser menores, e por isso, há menor utilização destas drogas. Propriedades maiores possuem maior tecnificação e costumam usar mais antimicrobianos, até mesmo porque estes também são muito utilizados na ração animal para estimular o crescimento dos animais de produção.

*E. coli* isoladas de queijos comercializados em Uberaba apresentaram maior resistência aos antimicrobianos testados. Esses resultados podem estar relacionados à maior tecnificação da produção de leite nessa região, o que pode refletir na maior utilização de antimicrobianos. Essa tecnificação se deve às exigências feitas pelo Instituto Mineiro Agropecuário (IMA) para o cadastramento de propriedades que produzem esse tipo de queijo regulamentado.

A Tetraciclina e os beta-lactâmicos foram os antimicrobianos com maior número de isolados resistentes. Isso pode ser explicado com um estudo prévio conduzido no Brasil, que mostra que os grupos beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais usados no tratamento para infecções em gado leiteiro, representando 38,22% do total de todos os antibióticos, seguido pelos aminoglicosídeos (25,19%) e a Tetraciclina (15,41%) (NETTO, et. al, 2005).

Durante dois anos de estudos realizados em Minneapolis, Estados Unidos, muitos alimentos vendidos ao varejo (particularmente carne de frango, mas também carne bovina e carne suína, e alguns alimentos prontos para o consumo) estavam contaminados com *E. coli* resistente a antimicrobianos sugerindo que os alimentos podem representar um significativo, mas não reconhecido veículo, para a



disseminação de importantes patógenos e de patótipos resistentes (JOHNSON, et. al, 2005). Em um estudo feito no Estado do Paraná, Brasil, foram coletadas 260 amostras de leite pasteurizado em diferentes estabelecimentos comerciais e foram obtidos 47 isolados de *E. Coli*. Também foram detectados altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos como a Ampicilina (19,2%), Cefalotina (18,9%) e Tetraciclina (17,1%) (ZANELLA et. al, 2010).

Outro estudo realizado no sul da Austrália entre dezembro de 2008 e junho de 2009, analisando 251 amostras de fezes de frango, 102 isolados (40,6%) foram resistentes à Tetraciclina, 67 (26,7%) à Ampicilina. Também foi observada resistência ao Trimetropim-sulfametoxazol (12,4%), Estreptomicina (10,8%) e outros antimicrobianos em baixas percentagens, mas não foi encontrada resistência para o Ceftiofur, Ciprofloxacina e Gentamicina (OBENG, et. al, 2012). Isso mostra que o uso de antimicrobianos está ocorrendo também em outras espécies de produção animal, sendo, portanto, de importância em saúde pública.

Neste estudo, mesmo que a prevalência de resistência dos isolados não tenha sido alta, nota-se que o uso indiscriminado de antimicrobianos vem crescendo e os queijos elaborados com leite cru são importantes veículos de disseminação, necessitando, assim, nas propriedades, programas para conscientização do uso de antimicrobianos no rebanho leiteiro.

Como resultados deste trabalho, o grupo filogenético A foi predominantemente resistente a Amoxicilina/Ácido clavulânico, Ampicilina e Tetraciclina e o grupo B a Tetraciclina e Estreptomicina (Tabela 7). Um estudo na Espanha, com *E. coli* carreando o gene *stx2*, isolados de ambientes aquáticos, mostrou que isolados do grupo A eram resistentes ao Cloranfenicol, Estreptomicina, Sulfametoxazole e Tetraciclina, enquanto o grupo B1 foram resistentes para Cloranfenicol, Sulfametoxazole e Tetraciclina e os do grupo B2 somente para Tetraciclina (GARCIA-ALJARO, et. al, 2009).. A partir destes dados, o grupo filogenético não está relacionado com a resistência antimicrobiana.

Tabela 7. Resistência antimicrobiana em isolados de E. coli de queijos elaborados a partir de leite cru de acordo com o agrupamento filogenético dos isolados baseado no método disco-difusão.

Grupo filogenético	Nº de isolados	Nº de isolados pelo No. De classes de antimicrobianos						Nº de isolados resistentes por classe de antimicrobiano e antimicrobiano															
		0	1	2	3	4	4-6	Aminoglicosídeos <sup>a</sup>			β-lactâmicos <sup>a</sup>			Sulfonamidas <sup>a</sup>			Fenicóis <sup>a</sup>			Quinolonas <sup>a</sup>			Tetraciclínas <sup>a</sup>
								GEN <sup>b</sup>	KAN <sup>b</sup>	STR <sup>b</sup>	AMP <sup>b</sup>	AMC	CRO <sup>b</sup>	FOX <sup>b</sup>	TIO <sup>b</sup>	FIS <sup>b</sup>	SXT <sup>b</sup>	CHL <sup>b</sup>	CIP <sup>b</sup>	NAL <sup>b</sup>	TET <sup>b</sup>		
A	50	33	8	4	2	3	0	1	1	7	6	0	3	0	1	2	0	0	1	3	12		
B1	43	27	6	7	1	2	0	1	3	7	7	0	1	1	1	0	0	0	0	0	7		
B2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
D	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<b>Total</b>	<b>95</b>																						

<sup>a</sup> Diferentes classes de antimicrobianos

<sup>b</sup> Antimicrobianos, Abreviações de antimicrobianos que foram usados no estudo são: Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC), Cefotiofur (TIO), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacin (CIP), Amikacin (AMK), Ampicilina (AMP), Cefoxítina (FOX), Gentamicina (GEN), canamicina, Ácido Nalidixico, Streptomina (STR), Trimetoprim-Sulfametoxazole (SXT), Ioramf enicol (CHL), Sulfisoxazole (FIS), Tetraciclina (TET).

Outro estudo realizado na Dinamarca entre novembro de 2005 e abril de 2006 com carne de frango, frangos, carne suína, suíno, humanos sadios e pacientes com infecções no trato urinário mostrou que os isolados do grupo A foram resistentes a Ampicilina, Estreptomicina e Tetraciclina e aqueles do grupo B à Estreptomicina e Tetraciclina e para os isolados desse grupo, a resistência daqueles provenientes de pacientes com ITU foi similar à resistência dos variados tipos de carne e dos isolados de animais. Os resultados sugerem que animais e alimentos podem ser fonte de *E. coli* resistentes para a comunidade e para os pacientes com ITU (JAKOBSEN, et. al, 2010).

A presença de genes que codificam resistência aos agentes antimicrobianos Ampicilina, Tetraciclina e a Ceftiofur (3<sup>a</sup> geração de Cefalosporina) foi determinada em 52 isolados (25 de Uberaba, 8 de Ribeirão Preto e 19 de Aracaju), sendo que o critério de escolha desses isolados foi baseado na resistência aos antimicrobianos, detectado no antibiograma. Em Uberaba, 6 (24%) dos isolados possuíam um ou mais genes de resistência (1 *bla*<sub>TEM</sub> e *tetB*; 1 *tetA*, 1 *bla*<sub>CMY-2</sub>; 1 *aadA* e *tetB* e 2 *tetB*). Em Aracaju, 8 isolados (42,10%) possuíam um ou mais genes de resistência (3 *tetB*, 1 *bla*<sub>TEM</sub>, 1 *tetA* e 3 *bla*<sub>TEM</sub> e *tetB*). Por outro lado, apenas 3 (37,5%) dos isolados de Ribeirão Preto foram positivos (2 *tetB* and 1 *tetA*). O gene mais comumente encontrado em todos os isolados foi o *tetB* n = 10 (58,82%), seguido de *bla*<sub>TEM</sub> n = 5 (29,41%).

No presente estudo foi verificado altas percentagens de isolados positivos para genes de resistência (*bla*<sub>TEM</sub>, *tetA*, *tetB*, *aadA*), assim como em um estudo com 109 isolados de ExPEC (39 isolados de animais e 70 de humanos) em que foi demonstrado que 68% dos isolados de animais apresentaram o gene *bla*<sub>TEM</sub>, 53% *tetA* e 44% *tetB* enquanto que os isolados de humanos mostraram uma prevalência de de 88%, 44% e 53%, respectivamente (MAYNARD, et. al, 2004).

Um estudo com *E. coli* de humanos e bovinos em um ambiente de fazenda na Noruega mostrou transferência de resistência a multidrogas entre isolados de *E. coli* de vacas leiteiras e os isolados dos habitantes da fazenda. Plasmídeos carregam determinados genes resistentes para diversos antimicrobianos, incluindo Tetraciclina, Estreptomicina e Sulfonamida (OPPEGAARD, et. al, 2001).

Em um estudo com 32 isolados de STEC de infecções em humanos (21) e de fezes bovinas (11) no Estado de São Paulo, 11(34,37%) mostraram resistência à ampicilina e carregavam o gene *bla*<sub>TEM</sub>, o qual foi confirmado como *bla*<sub>TEM-1</sub>. Segundo os autores, isso claramente representa um risco à saúde pública (CERGOLINO, et. al, 2011).

Em 251 amostras de fezes de frango, diversos genes de resistência foram investigados e a prevalência encontrada foi de 14 (5,57%) para neomicina (*aphA1*), de 25 (9,96%) para Espectinomicina-Estreptomicina (*aadA2*). Para os beta-lactâmicos (Ampicilina) a prevalência foi de 43 (17,13%) para *bla*<sub>TEM</sub>, 4 (1,59%) para *bla*<sub>SHV</sub>, e zero para *bla*<sub>CTX-M-3</sub> ou *bla*<sub>CMY-2</sub>, para sulfonamida (*sulI* e *sulII*) foi de 29 (11,55%). Com relação à Tetraciclina a prevalência foi de 48 (19,12%) para o gene *tet(A)*, 7 (2,78%) para o *tet(B)* e 4 (1,59%) para o *tet(C)* e para o antimicrobiano Trimetopim 26 (10,35%) isolados foram positivos para *dhfrV* and *dhfrXIII* (OBENG, et. al, 2012)..

O uso abusivo de antimicrobianos, e esse importante fato de que plasmídeos podem carrear esses genes transferindo-os horizontalmente, explica a disseminação da resistência de muitas drogas. Neste estudo, a prevalência de isolados com genes de resistentes não foi alta, entretanto a simples presença de alguns isolados pode significar risco para os demais, devido a essa transferência de genes.

#### **5.4. Os sorogrupos O4, O18 e O23 foram os sorogrupos mais encontrados.**

Os sorogrupos O4, O18 e O23 foram os mais comumente observados e encontrados nas cidades de Uberaba e Ribeirão Preto, como pode ser observado na Tabela 8. Os isolados que aglutinaram contra os antígenos O4 e O18 pertenceram ao grupo B1 e foram encontrados em Uberaba (Tabela 9). Em Ribeirão Preto, foi encontrado um isolado pertencente ao sorogrupo O18 e três isolados pertencentes ao sorogrupo O23. É importante ressaltar que os sorogrupos O4, O18 e O23 encontrados vieram de diferentes queijos.

Tabela 8. Quantidade de isolados dos principais sorogrupos encontrados nos três municípios onde foram feitas as coletas.

Cidade	Total	Sorogrupo					
		O4, O18	O23	O15	O5, O21, O34, O73, O120, O159	O34, O54, O82, O141	NT
Uberaba	29	5			2	4	18
Ribeirão Preto	16		3		1		12
Aracaju	49			1	4		44

Tabela 9. Relação entre grupo filogenético e sorogrupo O em *E. coli* de queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado em três municípios.

Grupo filogenético	No. total de isolados	No. de isolados do sorogrupo				
		O4	O18	O23	Outros	NT
A	25			3	6 <sup>a</sup>	16
B1	25	2	3		2 <sup>b</sup>	18
B2	1					1
D	1				1 <sup>c</sup>	0
Total	52	2	3	3	9	35

<sup>a</sup> Um isolado de cada sorogrupo O5, O21, O34, O73, O120, O159.

<sup>b</sup> Um isolado de cada sorogrupo O34, O54

<sup>c</sup> Um isolado do sorogrupo O15

Com o aumento de estudos em alimentos como fonte de patógenos, sabem-se atualmente do potencial zoonótico de isolados de animais que possuem sorogrupo O principalmente aqueles que têm fatores de virulência associados. Os dados desse trabalho revelam a presença de dois isolados O4, três isolados O18 e três isolados O23. Os três sorogrupos encontrados podem causar doenças em humanos. Isso mostra que o queijo elaborado a partir de leite não pasteurizado pode ser uma fonte de importantes patógenos e, então, representa risco potencial à saúde pública.

Em uma coleção de 526 amostras médicas e veterinárias de diversos países, nas quais 436 isolados eram APEC, 65 *E. coli* uropatogênica (UPEC) e 25 *E. coli* causadora de meningite em recém-nascidos (NMEC), foi encontrado em 4,8% das cepas o sorogrupo O18 em APEC, 3,07% em UPEC e 28,6% em NMEC, sendo que a maioria dos isolados foram do grupo filogenético A (40,5%) e B2 (40,1%). Os autores sugerem que APEC tem potencial zoonótico, não só as do grupo B2, como também as do grupo A, podendo assim causar infecção no trato urinário e meningite em recém-nascidos (EWERS, et. al, 2007).

O estudo em Minneapolis, Estados Unidos, com diversos alimentos, encontrou *E. coli* O4 e O18, que são muito similares àqueles encontrados em infecções humanas. Dos isolados, 17 eram ExPEC do grupo filogenético B2 e D (JOHNSON, et. al, 2005). A exigência de fatores de virulência de ExPEC para a patogênese é consideravelmente reduzida quando a pessoa é imunocomprometida devido à idade, estado imunológico, ou doença imunossupressoras. Por exemplo, um grupo de cepas causou meningite neonatal apenas nos recém-nascidos com baixa imunidade (BINGEN, et. al, 1998).

Pode-se ressaltar que existe uma grande relação entre nutrição e saúde, e os queijos coletados nesse trabalho têm importantes sorogrupos e podem estar associados a doenças extra intestinais em humanos como, por exemplo, meningite, infecções do trato urinário, entre outras, e então, seu consumo sem medidas sanitárias é um risco à saúde pública, independentemente do grupo filogenético.

#### **5.5. O gene de resistência para ampicilina, *bla*<sub>TEM</sub>, foi encontrado apenas no grupo filogenético A.**

O gene de resistência à ampicilina, *bla*<sub>TEM</sub>, foi encontrado apenas no grupo filogenético A e os isolados foram a maioria obtidos em Aracajú (71,42%) Entretanto, com relação ao método de disco-difusão, a resistência ao antimicrobiano Ampicilina foi maior em Uberaba. O gene *aadA1* foi mais comum no grupo filogenético B1 (75%) (Tabela 10).

Tabela 10. Isolados de *E. coli* de queijos provenientes de leite cru positivos para genes de resistência relacionados com o grupo filogenético (GF).

GF	N° de isolados resistentes à AMP	a			N° de isolados resistentes à STR	b		N° de isolados resistentes à TET	c		
		<i>bla<sub>CMY</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	None		<i>aadA</i>	None		<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	None
A	7	1	5*	1	1	0	1	12	0	9*	4
B1	7	0	0	7	3	1*	3	7	2	3	2
B2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a- N° (%) de isolados resistentes à Ampicilina (AMP) possuindo genes resistentes à  $\beta$ -lactamase.

b- N° (%) de isolados resistentes à Estreptomicina (STR) possuindo o gene *aadA*

c- N° (%) de isolados resistentes à Tetraciclina (TET) possuindo genes *tet*

\*Um dos isolados tem o gene, porém não expressou resistência ao antibiótico no método de disco-difusão.

Interessantemente, o gene de resistência à Ampicilina, *bla<sub>TEM</sub>*, foi encontrado apenas em isolados de Aracaju, todos pertencentes ao grupo filogenético A, considerando que a prevalência de Ampicilina no método de disco-difusão foi maior em Uberaba. Isso pode ser explicado devido ao fato que as possíveis fontes de resistência entre as cidades sejam diferentes. Em Uberaba, é possível que outros genes, tais como o *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, e *bla<sub>CTX</sub>*, que também estão relacionados a resistência à Ampicilina, sejam os responsáveis pela resistência. Em um estudo com fezes de aves, o gene *bla<sub>TEM</sub>* foi encontrado nos grupos filogenéticos A, B1 e D (OBENG, et. al, 2012). Isolados de *E. coli* em hospitais no sul da África verificaram o gene *bla<sub>TEM</sub>* em isolados do grupo filogenético B2 e D e em diferentes estabelecimentos e diferentes origens (pus e urina) (PEIRANO et. al, 2011). Portanto, o gene *bla<sub>TEM</sub>* não está relacionado somente com o grupo filogenético A, isso variando de acordo com a fonte de resistência de cada local.

Outro fato importante deste estudo foi a presença de dois isolados possuindo genes, *bla<sub>TEM</sub>* e *tetB*, porém que não expressaram resistência aos antimicrobianos Ampicilina e Tetraciclina, respectivamente, no método de disco-difusão. Como esta não expressão é incomum, seria preciso um PCR a tempo real para analisar melhor o nível de expressão desse gene, pois pode ser que ele não expressou suficiente para criar resistência ou pode ser que não tenha acontecido a tradução para a proteína. Isto não ocorreu no estudo com carne crua (bovina, suína e de frango) e marisco no Vietnã, entre fevereiro e junho de 2004, que foi analisado a resistência a antimicrobianos no método disco-difusão e a presença genes de resistência pelo

PCR e todos os isolados que possuíam genes de resistência para um determinado antimicrobiano expressaram resistência no método disco-difusão (VAN et. al, 2008).

### **5.6 Clones foram encontrados em isolados de diferentes cidades, diferentes queijos e de mesmos queijos.**

Alguns isolados (18A, 1, 12, 10, 7) de queijos do município de Uberaba demonstraram alto nível de similaridade. Houve clones isolados do mesmo queijo (isolados 71 e 72; 18 e 21), de diferentes queijos da mesma cidade (isolados 18, 19B e 21; 53 e 54A) e interessantemente, os isolados 29 e 77 são idênticos e de diferentes municípios (Ribeirão Preto e Uberaba) como pode ser observado na Figura 13, que mostra o dendograma dos isolados.

Foram identificados nove clones predominantes em sete diferentes queijos. Os clones provenientes de diferentes queijos e do mesmo supermercado (18, 19B e 21) são provavelmente da mesma fazenda. Foram detectados dois clones da mesma cidade (53 e 54A), porém de supermercados diferentes e um deles foi resistente ao antimicrobiano Sulfisoxazole e o outro apresentou o gene da resistência a Tetraciclina (*tetB*). Entretanto, a probabilidade de eles serem da mesma fazenda é baixa, pois há essa diferença em relação ao gene de resistência. É importante ressaltar que foi encontrado o mesmo clone em duas cidades diferentes (isolados 29 e 77), porém eles apresentaram diferenças, sendo um resistente à Amoxicilina/Ácido Clavulânico e o outro é resistente a Ampicilina e portando o gene de resistência à tetraciclina (*tetA*) e ambas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes fontes de resistência entre as fazendas e os municípios. Outro dado importante deste estudo é que alguns isolados mostraram alta variabilidade genética.



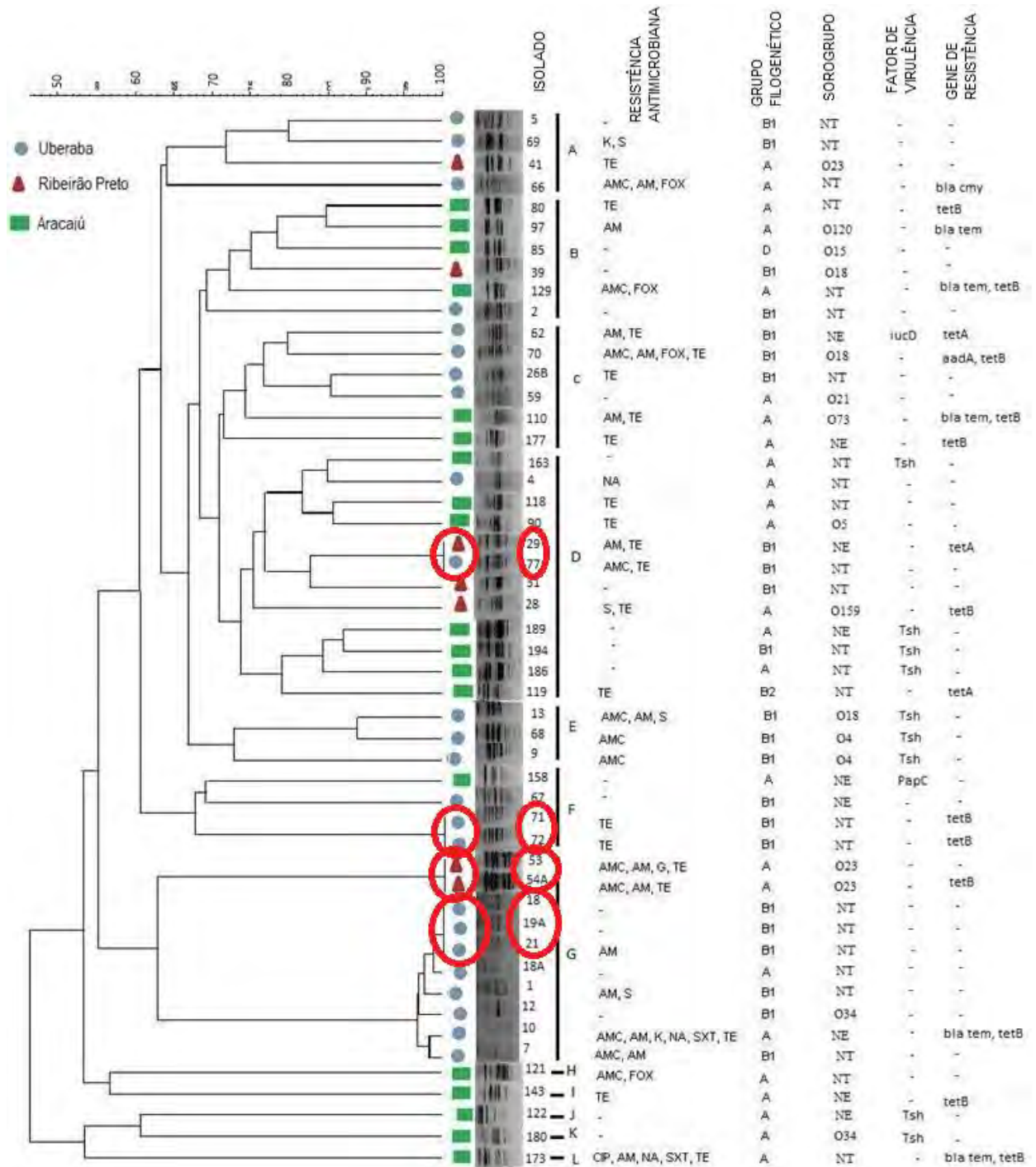


Figura 13. Resultado da eletroforese em campo pulsado (PFGE) entre os isolados de diferentes queijos em três diferentes municípios. O dendrograma foi feito usando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização e construído com o método de agrupamento UPGMA, usando-se o programa BioNumerics 5.0.

A presença de clones é de extrema importância para a saúde pública, pois eles são mais resistentes fenotipicamente e genotipicamente com relação aos demais isolados, tendo uma maior facilidade de sobrevivência no ambiente. E, mesmo que não sejam patogênicos, eles podem oferecer perigo devido à transferência de genes. Isso faz com que exista um risco maior à saúde pública, uma vez que podem receber genes de virulência ou mesmo genes de resistência. A presença de alta variabilidade genética dos isolados também é relevante, já que demonstra a contaminação intensa dos queijos por *E. coli*, mostrando que realmente existe ineficiência na higiene durante todo o processo de produção de queijos e, que provavelmente, são diversas as fontes de contaminação durante a cadeia de produção deste tipo de queijo elaborado a partir de leite não pasteurizado.

Um estudo com *E. coli* de isolados de infecções do trato urinário (ITU) de mulheres, carnes e restaurantes com comidas prontas-para-comer, mostrou que os isolados de carne de frango e outros alimentos estão relacionados com aqueles isolados de ITU (VINCENT, et. al, 2010)..

Em outro estudo, também com isolados de ITU, em humanos e diferentes tipos de carnes (bovina, frango e suína), os autores encontraram similaridades entre *E. coli* de animais de abatedouros, principalmente frangos, e aquelas associadas a ITU em humanos. Para os autores deste trabalho, os alimentos de origem animal podem ser responsáveis pelas infecções em humanos, e os frangos são grandes reservatórios. Frangos são reservatórios de patógenos para humanos e isto poderia ser usado para a procura de outras potenciais rotas de transmissão e para fortalecer a conexão entre consumo de frango e ITU e novas medidas precisam ser tomadas para diminuir o nível de contaminação desse alimento e o risco de transmissão de doenças (BERGERON, et. al, 2012).

O mesmo acontece com os queijos produzidos a partir de leite cru. A fiscalização deveria ser mais intensa, pois seu consumo representa risco potencial à saúde pública. As autoridades sanitárias deveriam investigar novas rotas de contaminação para reduzir o número de micro-organismos, e conseqüentemente o número de patógenos.

## 6. CONCLUSÕES

- A maioria dos isolados pertenceu ao grupo filogenético A e B1, provavelmente porque são isolados comensais, não descartando o potencial risco à saúde pública.
- Sorogrupos importantes como O4, O18 e O23, foram encontrados e são potencialmente patogênicos.
- A resistência a antimicrobianos e a presença de genes de resistência foi moderada, porém estão relacionadas com os antimicrobianos de uso em humanos.
- A presença de clones e a alta variabilidade genética são significativas, pois clones sobrevivem melhor no meio ambiente e isolados de alta variabilidade genética demonstra a falha em diversos pontos da produção desse tipo de queijo.

Os queijos estudados possuem má qualidade higiênica e estirpes de *E. coli* potencialmente patogênica, e, por esse motivo, representam um risco potencial à saúde pública.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa propôs, como objetivo geral, verificar a presença de *E. coli* potencialmente patogênica. O conhecimento do perfil molecular da *E. coli* auxilia na melhor compreensão dos estudos epidemiológicos de dispersão destes patógenos nos queijos investigados.

Os resultados obtidos corroboram o potencial risco desse tipo de queijo elaborado a partir de leite não pasteurizado para a saúde pública e a participação dos bovinos leiteiros como importantes reservatórios destes micro-organismos.

Tais achados corroboram, ainda, com a imperiosa necessidade de adoção de algumas medidas voltadas para conscientização da população que produz este queijo clandestinamente (em Aracaju e em Ribeirão Preto) e legalmente (Uberaba) e a conscientização também por parte do IMA, de que os queijos produzidos em Uberaba e em todo o Estado de Minas Gerais, mesmo sendo legal, deve ser fiscalizado.

É necessário um trabalho de educação e saúde para os produtores mostrando a importância e cuidado durante a higiene e manipulação durante toda a cadeia produtiva, assim como capacitação de mão de obra.

A fiscalização deste tipo de alimento deve ser alta, assim como a fiscalização de sanidade do gado para doenças como tuberculose e brucelose, pois este tipo de alimento pode ser veículo de disseminação não só de *E. coli*, mas como também de diversos agentes de importância em saúde pública.

## 8. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D. P. S., M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec**, v. 54, n. 4, 2002.

ALMEIDA FILHO, E. S., LINDNER, A. L., ALMEIDA, D. S., SIGARINI, C. O., FERREIRA, M. B. Perfil microbiológico do queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal e inspecionado, comercializado no município de Cuiabá, MT. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92/93, p. 51-56, 2002.

ALMEIDA, P. M. P., FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e Coliformes Fecais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.

APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association.**, v. 4, p. 676, 2001.

ARAÚJO V.S., PAGLIARES V.A., QUEIROZ M.L., FREITAS-ALMEIDA A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1172–1177, 2002.

BARBOSA, J. A. A., OLIVEIRA, F.G.S., BELÉM, L. F., MEDEIROS, A.C.D. Riscos de utilização de aminoglicosídeos em pacientes oncológicos. . **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 6, p. 812-819, 2008.

BARBOSA, L. JORGE, A.O.C., UENO, M. . Incidência de Staphylococcus coagulase positiva em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 21, n. 148, p. 105-109, 2007.

BARROS, P. C. O. G. D. N., LUCIANA CARDOSO; RODRIGUEZ, ÉRIKA MENEZES; CHIAPPINI, CLAUDETE CORRÊA DE JESUS. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 57-66, 2004.

BAYLIS, C. L. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing Escherichia coli. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 293-307, 2009.

BEUTIN, L. K., G.; ZIMMERMANN, S.; KAUFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BHAGWAT, A. A. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella strains by real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 84, p. 217-224, 2003.

BINGEN, E., PICARD, B., BRAHIMI, N., MATHY, S., DESJARDINS, P., ELION, J., DENAMUR, E. Phylogenetic Analysis of Escherichia coli Strains Causing Neonatal Meningitis Suggests Horizontal Gene Transfer from a Predominant Pool of Highly Virulent B2 Group Strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 642–650, 1998.

BLANCO, J. E. B., A. MORA, G. DAHBI, M. P. ALONSO, E. A. GONZÁLEZ, M. I. BERNÁRDEZ AND J. BLANCO. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae ). **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 645-651, 2004.

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

BONFOH B. , WASEM A., TRAORÉ A.N. , FANÉ, A. , SPILLMANN, H. , SIMBÉ, C.F., ALFAROUKH, I.O. , NICOLET, J. , FARAH, Z. , ZINSSTAG, J. Microbiological quality of cows milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, v. 14, p. 495–500, 2003.

BYWATER, R., DELUYKER, H., DEROOVER, E., DE JONG, A., MARION, H., MCCONVILLE, M., ROWAN, T., SHRYOCK, T., SHUSTER, D., THOMAS, V., VALLE, M., WALTERS, J. . A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and comensal bacteria isolated from food-producing animals. **J. Antimicrob. Chem.**, v. 54, p. 744-754, 2004.

CÂMARA, S. A. V., AMARAL, G. B.C., MULLER, M. T., SILVEIRA, K. C. S., ALMEIDA, T. N., MEDEIRO, C. F. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CAMPOS, M.R.H., ANDRÉ. M. C. D. P. B., BORGES, L.J., KIPNIS, A., PIMENTA, F.C., SERAFINI, A.B. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 5, p. 1203-1209, 2009.

CAMPOS, T. A., LAGO, J. C., NAKAZATO, G., STEHLING, E. G., BROCCHI, M., CASTRO, A. F. P., SILVEIRA, W. D. Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 533-540, 2008.

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

CARDOSO, P. A. J. U., 2009. 75P. 2009. Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de shiga toxina em queijo mussarela produzido artesanalmente. Dissertação - Programa em Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CARVALHO, H. H. WIEST, J.M.; GRECO, D.P. . Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisia dracunculus* Linn. (Asteraceae), variedade inodora – estragão -, frente à *Salmonella* sp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , v. 26, n. 1, 2006.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262–267, 2007.

CARVALHO, R. L. D. LEVANTAMENTO DE ALGUNS CASOS DE TOXINFECÇÃO ALIMENTAR (DTA“S) DE ORIGEM BACTERIANA RELATADOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 1994 A 2006. **Monografia apresentada ao Programa de PósGraduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção de Título de Especialista em Microbiologia.**, 2007.

BERGERON, C. R., PRUSSING, C. BOERLIN, P., DAIGNAULT, D., DUTIL, L., REID-SMITH, R. J., ZHANEL, G. G., MANGES, A. R. Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli in Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 415-421, 2012.

CERGOLE-NOVELLA, M. C., PIGNATARI, A., C. C., CASTANHEIRA, M., GUTH, B. E. C. Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing Escherichia coli strains (STEC) in Brazil. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 117 - 123, 2011.

CERQUEIRA, M. M. O. P. SOUZA., M. R.; FONSECA, L. M.; RODRIGUES, R.; RUBINICHI. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas Frescal em Pará de Minas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 46, n. 6, p. 723-728, 1994.

CHYE, F., ABDULLAH, A., AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 535–541, 2004.

CLARKE, S. C. HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P. E.; WILLIAMS, P. H. . Virulence of Enteropathogenic Escherichia coli, a Global Pathogen. . **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 365–378, 2003.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E.. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 66, p. 4555–4558, 2000.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, #45). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals**. 2008.

COHEN, M. L. Changing patterns of infections disease. **Nature Rev.**, v. 406, p. 762-767, 2000.



CUNHA C. R., VIOTTO, W. H., VIOTTO, L. A.. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat „Minas Frescal” cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 215-224, 2006.

DONNELLY, J. P., VOSS, A., WHITE, W., MURRAY, B.E. . Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? . **J. Antimic. Chemoth**, v. 37, p. 389-392, 1996.

ESPIÉ, E., VAILLANT, V., MARIANI-KURKDJIAN, P., GRIMONT, F., MARTIN-SCHALLER, R., DE VALK, H. . Escherichia coli O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats” cheese. **Epidemiology and Infection**, v. 134, p. 143–146, 2006.

EWERS, C., LI, G., WILKING, H., KIEBLING, S., ALT, K., ANTA’O, E. A., LATURNUS, C., DIEHL, I., GLODDE, S., HOMEIER, T., BOHNKE, U., STEINRUCK, H., PHILIPP, H., WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 163–176, 2007.

FEITOSA, T. B., M.DE.F., NASSU, R.T., AZEVEDO, E.H.I.DE., MUNIZ, C.R. Pesquisa de Salmonella sp, Listeria sp e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FERNANDES, A. M. A., E.; OLIVEIRA, C.A.F.DE. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 20, n. 144, p. 4-56, 2006.

FERREIRA; A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. di; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. Z. Doença das Aves. **FACTA**, v. 4.2, p. 457-482, 2009.

FOX, P. F. Cheese: chemistry, physics and microbiology. **Chapman & Hall**, v. 2, p. 601, 1993.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. Ed. **Atheneu**, **São Paulo.**, p. 182, 2002.

GALES, A. C., PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N.; BARETTA, M.; SADER, H.S. . Avaliação da atividade in vitro dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenems contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. **Rev. Assoc. Med. Bras.** , v. 43, n. 2, p. 137-144, 1997.

GARCIA-ALJARO, C., MORENO, E., ANDREU, A., PRATS, G., BLANCH, A. R. Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in stx2 gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 585-591, 2009.

GILMAN, A. G. RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. GOODMAN & GILMAN'S. . The pharmacological basis of therapeutics. **New York: McGraw Hill.**, 1996.

GUERREIRO, P. K., MACHADO, M. R. F., BRAGA, G. C., GASPARINO, E., FRANZENER A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Revista Ciências e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

GYLES, C. L. FAIRBROTHER, J. M. . *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.;PRESCOTT, J. F.;SONGER, G. ;THOEN, C. O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. **New York:Wiley-Blackwell**, v. 4 ed, p. p.267-308., 2010.

HAJDENWURCEL, J. R. Produção segura na cadeia alimentar do leite. **Segurança alimentar na cadeia do leite.**, p. 99-112, 2002.

HOFFMANN, F. L. G., T.M.V.; COELHO, A.R.; HIROOKA, E.Y.; HOFFMANN, P. Qualidade microbiologia de queijos ralados de diversas marcas comerciais, obtidos do comércio varejista do município de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 62-66, 2004.

JAKOBSEN, L. KURBASIC, A., SKJØT-RASMUSSEN, L., EJRNÆS, K., PORSBO, L. J., PEDERSEN, K., JENSEN, L. B., EMBORG, H., AGERSØ, Y., OLSEN, K. E. P., AARESTRUP, F. M., FRIMODT-MØLLER, N., HAMMERUM, A. M.. Escherichia coli Isolates from Broiler Chicken Meat, Broiler Chickens, Pork, and Pigs Share Phylogroups and Antimicrobial Resistance with Community-Dwelling Humans and Patients with Urinary Tract Infection. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v. 7, n. 5, 2010.

JOHNSON, J. R., KUSKOWSKI, M. A., SMITH, K., O'BRYAN, T. T., TATINI, S.. Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli in Retail Foods. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 1040–1049, 2005.

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

KAPER, J. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n. 130-133, 1996.

KAPER, J. B. NATARO, J.P.; MOBBLEY, H.L.T. Pathogenic Escherichia coli. . **Nature Rev.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KESKIMAKI, M. E., M.; PERSONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. . EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 40, 2001.

KLEIN, G., BULTE, M.. Antibiotic susceptibility pattern of Escherichia coli strains with verocytotoxic E. coli-associated virulence factors from food and animal faeces. **Food Microbiology**, v. 20, p. 27–33, 2003.

KONEMAN, E. W. A., S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN J. W. C. Diagnóstico Microbiológico. **Medsi**, v. 5ed., p. 177-261, 2001.

KONOWALCHUK, J. SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. . **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

KOSIKOWSKY, F. Cheese and fermented milk foods. **New York: Cornell University**, p. 429, 1970.

KUHNERT, P., BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

LANCE HONISH, G. P., MD, NYALL HISLOP, LINDA CHUI, KINGA KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, LARRY TROTTIER, CORNELIA KREPLIN, INGRID ZAZULAK, . An Outbreak of E. coli O157:H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. **CANADIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH**, v. 96, n. 3, p. 182-184, 2005.

LAW, D. Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxinproducing E. coli. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 729-745, 2000.

LOGUERCIO, A.P., ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LOUIS-PHILIPPE MÉNARD, J. G. L., FRANÇOIS LÉPINE, CRISTINA PAIVA DE SOUSA, J.DANIEL DUBREUIL. Expression, purification and biochemical characterization of enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1. **Protein Expression and Purification**, v. 33, p. 223-231, 2004.

MANTILLA, S. P. S., FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.DE.; GOUVÊA, R. . Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp isoladas de carne moída bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.

MARTINS, R. P., SILVA, M. C., DUTRA, V., NAKAZATO, L., LEITE, D. S. Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in Brazil. **Meat Science**, v. 10, p. 1016, 2012.

MAYNARD, C., FRANC, S. B., SANSCHAGRIN, O., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIE`RE, S., HAREL, J. Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 42, n. 12, p. 5444–5452, 2004.

MAYNARD, A. D., BARON, P.A., SHVEDOVA, A.A., KISIN, E.R., AND CATRANVA, V. . Exposure to carbon nanotube material 1: Aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotube material. **Toxicology and Environmental Health.**, 2003.

MENEZES, E. A., MACEDO., F.V.V.; CUNHA, F.A.; ANDRADE, M.DO S.DE.S.; ROCHA, M.V.A.DE.P. . Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edílson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE. . **RBAC**, v. 36, n. 4, p. 209 - 212, 2004.

MENG, J. F., P.; DOYLE, P. IN: DOWNES, F. P.; ITO, K. . Pathogenic *Escherichia coli*. . **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.**, v. 4, p. 331-341, 2001.

MORA, A., BLANCO., J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. . Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 793-806, 2005.

MOTA, R. A., SILVA, K.P.C. DA; FREITAS, M.F.L.DE; SILVA, L.B.G.DA. . Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. . **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOXLEY, R. A. SMITH, D. R. . Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. . **Veterinary Clinics of Food Animal**, v. 26, n. 1, p. 29-56, 2010.

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

NETTO, D. P., LOPES, M. O. OLIVEIRA, M. C. S., NUNES, M. P., JUNIOR, M. M., BOSQUIROLI, S. L., BENATTO, A., BENINI, A., BOMBARDELLI, A. L. C., FILHO, D. V., MACHADO, E., BELMONTE, I. L, ALBERTON, PEDROSO, P. P., SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

NGUYEN, R. N. TAYLOR, L. S., TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. . Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 597-603, 2006.

O'BRIEN, M. et al. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. **Food Microbiology**, v. 26, p. 910–914, 2009.

OBENG, A. S., RICKARD, H., NDI, O., SEXTON, M., BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 305–315, 2012.

OKURA, M. H. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO. **Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária)**. 2010.

OPPEGAARD, H., STEINUM, T. M., WASTESON, Y.. Horizontal Transfer of a Multi-Drug Resistance Plasmid between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a Farm Environment. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 67, n. 8, 2001.

ORSKOV, I., ORSKOV, F., JANN, B., KLAUS, J. Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*. **BACTERIOLOGICAL Reviews**, v. 41, n. 3, p. 667-710, 1977

PANETO, B.R., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., MACEDO, C., SANTO, E., MARIN, J. M.. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.

PATON, J. C. P., A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 450-479, 1998.

PEIRANO, G., GREUNE, C. H. J. V., PITOUT, J. D. D. Characteristics of infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, p. 449–453, 2011.

PIDDOCK, L. J. V. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, p. 1-3, 1996.

RAMOS, S.R.T.S. Risk factors for EPEC infection. **Rev Microbiol**, v. 27, n. 1, p. 34-39, 1996

RAPINI, L. S. TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, S.N.E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec. Belo Horizonte.** , v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

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

RIBEIRO, J. A. Queijos do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 14, n. 83, p. 33-34, 1959.

RIBOT, E. M., FAIR, M. A., GAUTOM, R., CAMERON, D.N., HUNTER, S.B., SWAMINATHAN, B., BARRETT, T. J.. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v. 3, p. 59-67, 2006.

RILEY, L. W., REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England of Journal Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

ROOS, T.B., SCHEID FILHO, V.B., TIMM, C.D., OLIVEIRA D.S. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. **Higiene Alimentar**. v. 19, p. 94-96. 2005.



RUSSO T.A., JOHNSON J. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. **Journal Infectious Disease**, v. 181, p. 1753–1754, 2000.

SANTIAGO, F. E. THOMAS, S. W.; CYNTHYA, L. W.; MARGARET, A. R.; RICHARD, E. L. . Genomic Divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates, Valencia, Spain. **International Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 271-278, 2005.

SANTOS, A. C. M., PIGNATARI, A.C.C., SILVA, R.M.; ZIDKO, A.C.M.; GALES, A.C. . A Virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SCHMIDT, M. A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 1544-1552, 2010.

SCHOUTEN J.M., BOUWKNEGT M., VAN DE GIESSEN A.W., FRANKENA K., DE JONG M.C., GRAAT E.A. Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 64, n. 1, p. 49-61, 2004.

SHAW, R. K. CLEARY, J.; MURPHY, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. . Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1243–51, 2005.

SILVA, Z. N. D. C., A.S.DA.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.DE.A.M.; ALMEIDA, A.C.DE.F.S.; QUEIROZ, M.L.P. . Isolamento e identificação sorológica de *Escherichia coli* enteropatogênica em leite pasteurizado. **Rev. Saúd. Públic.** , v. 35, n. 4, p. 375-379, 2001.

SIMANGO, C. Isolation of Escherichia coli in foods. **Cent Afr J Med**, v. 41, p. 181-185, 1995.

SIQUEIRA, R. S. Manual de Microbiologia de Alimentos. **Brasília: Merck.** , p. 73-116, 1995.

SMITH, J. L. FRATAMICO, P.M., GUNTHER, N.W. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. . **Foodborne Pathog. Dis.** , v. 2, n. 4, p. 134-163, 2007.

SOBRINHO, P. S. C., FARIA, C. A. M., PINHEIRO, J., S., ALMEIDA, H. G., PIRES, C., V. SANTOS, A. S. Bacteriological Quality of Raw Milk Used for Production of a Brazilian Farmstead Raw Milk Cheese. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v. 9, n. 2, p. 138-144, 2012.

T.B. ROOS, V. B. S. F., C.D. TIMM, D.S. OLIVEIRA. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

TAVARES, W. Manual de quimioterápicos antinfeciosos. . **Rio de Janeiro: Atheneu**, p. 770p, 1990.

TESH, V. I., O'BRIAN, A. D. . The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga like toxins. . **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1817-1822, 1991.

VAN, T. T. H., CHIN, J., CHAPMAN, T., TRAN, L. T., COLOE, P. J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 217–223, 2008.

VICENTE, L. C. P., TEIXEIRA, L. M. F. NIGUEZ-ROJAS, L.; LUNA, M. G.; SILVA, L. ANDRADE, J. R. C.; GUTH, B. E. C. . Outbreaks of cholera-like diarrhea caused by

enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon Rainforest. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 9, p. 669-674, 2005.

VILELA, D. LEITE., J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. **Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, 2002.

VINCENT, C., BOERLIN, P., DAIGNAULT, D., DOZOIS, C. M., DUTIL, L., GALANAKIS, C., REID-SMITH, R. J., TELLIER, P. P., TELLIS, P. A., ZIEBELL, K., MANGES, A. R. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 88-95, 2010.

ZANELLA, G. N., MIKCHA, J. M. G., E. BANDO, V. L. D. SIQUEIRA, AND M. MACHINSKI, JR. Occurrence and Antibiotic Resistance of Coliform Bacteria and Antimicrobial Residues in Pasteurized Cow's Milk from Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 9 p. 1684–1687, 2010.

ZHAO, Y., GRAN,B., PINILLA,C., MARKOVIC-PLESE,S., HEMMER,B., TZOU,A., WHITNEY,L.W., BIDDISON,W.E., MARTIN,R. AND SIMON,R. . Combinatorial peptide libraries and biometric score matrices permit the quantitative analysis of specific and degenerate interactions between clonotypic T-cell receptors and MHC-peptide ligands. . **J. Immunol**, v. 167, p. 2130-3141, 2001.

## ANEXO 1

### Template preparation

Cultures streaked onto solid media (e.g. TSA, blood Agar or MacConkey Agar) are processed as follows:

- Take a streak from the first quadrant with a loop and inoculate in a tube of 5 ml of LB broth.
- Swabs from feces or tissues are placed in a tube of 5 ml of LB broth.
- Incubate overnight at  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### DNA template

(Adapted from the method used by the Laboratory for Foodborne Zoonoses MFLP-86)

- Identify the sample by a code on the cap of the 1.5 ml tube, centrifuge 1 ml of LB broth culture incubated overnight at  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , at 12 000 RPM for 2 minutes.
- Discard the supernatant in a Corning bottle reserved for this use.
- Add 1 ml PBS or FA buffer (Difco) to the pellet, mix well (vortex or up and down with pipetter).
- Centrifuge at 12 000 RPM for 2 minutes, remove the supernatant and resuspend the pellet in 0.5 ml of sterile water Milli-Q (vortex or up and down with pipetter).
- Heat at  $100^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes, centrifuge at 12 000 RPM for 2 minutes. Transfer the supernatant to another tube, and identify the tube. When preparing a large number of tubes, ensure that the tubes containing DNA are kept on ice or cold.
- Conserve sample DNA tubes at  $-20^{\circ}\text{C}$  if not tested immediately.