

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Maria Raquel Hidalgo Campos**

**TIPIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Escherichia coli***  
**ISOLADAS DE MANIPULADORES, LEITE CRU E QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Orientador: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta**

**Tese de Doutorado**

**Goiânia-Go**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**Maria Raquel Hidalgo Campos**

**TIPIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Escherichia coli***  
**ISOLADAS DE MANIPULADORES, LEITE CRU E QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Orientador: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta**

**Tese submetida ao CPGMT/UFG**  
**como requisito parcial para obtenção**  
**do título de Doutor em Medicina**  
**Tropical, área de concentração de**  
**Microbiologia.**

**Goiânia-Go**

**2006**

## DEDICATÓRIA

*A lembrança de nossos laços genéticos  
nos submete à deliciosa  
sensação de imortalidade...*

*À minha avó, Antônia Ribeiro,  
que nos deixou um legado de  
dignidade, força e sabedoria.  
Meu anjo de ternura.*

*Aos meus pais, Plínio e Nílma,  
exemplos de amor incondicional.  
Eternos guardiões da minha vida.*

*Aos meus filhos, Daniel e Letícia,  
fontes de coragem e alegria.  
Guardiões do nosso futuro.*

*Com todo meu amor e carinho...*

*“... a simplicidade é o que há de mais  
difícil no mundo :  
é o extremo da experiência  
e o último degrau da sabedoria,  
o que sabemos é uma gota,  
o que ignoramos é um oceano ...”*  
*(Sir Isaac Newton)*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Álvaro Bisol Serafini meu grande amigo. Vossa orientação não se pautou apenas nos questionamentos técnicos, mas principalmente no apoio contínuo, compreensão, tolerância e amizade. Obrigada pelo acreditar...

À minha amiga irmã Maria Cláudia André. Sua ajuda sempre presente foi fundamental na superação de minhas dificuldades profissionais e dos sustos de minha vida pessoal. Obrigada por tudo e pela nossa amizade imensurável...

À minha co-orientadora Fabiana Cristina Pimenta, pelo estímulo, amizade e ajuda.

Ao Professor André Kipnis, pelo seu valioso espírito científico, contribuição nos momentos críticos, tolerância, compreensão e amizade.

À Liana Jayme Borges, minha amiga e fiel companheira, pela ajuda sempre tranquila e solidária.

Ao proprietário e colaboradores do laticínio que permitiram a obtenção das amostras. Obrigada pela possibilidade de realização deste estudo.

Às colegas de pós-graduação, Ana Beatriz Mori, Carla Atavila, Daniela Vilela, Juliana Lamaro, Lara Stefânia Leão, Letícia Aparecida Silva, Lúcia Kioko e Souza, Luciana da Silva Cruz, Megmar Carneiro e Talissa de Moraes Tavares, pelos momentos de dificuldades e alegrias compartilhados.

Às colegas Patrícia Pimentel e Lethícia Amorim, pela colaboração nas análises microbiológicas e pelo carinho constante.

À Professora Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade, por disponibilizar o equipamento de PFGE e outras ferramentas necessárias a este trabalho.

Aos funcionários José Clementino da Silva e Kariny Vieira Soares, pela competência, acessibilidade e atendimento.

Ao Aristides José Barbosa, Vera Lúcia da Penha, Leda Maria e Ágabo Macedo da Costa, funcionários dos laboratórios, pela grande colaboração na realização do trabalho prático.

Aos Professores André Kipnis, Luiz Artur Bataus e Wília Marta Diederichsen de Brito, pelas observações e sugestões oportunas como membros da banca de qualificação.

Aos professores Roberto Daher, Divina das Dores Cardoso, Regina Maria Bringel e Ana Lúcia Sgambatti de Andrade pela atuação competente e compreensiva durante o período que dirigiram a pós-graduação no IPTSP.

Ao Professor Ricardo Titze da Universidade de Brasília, pela receptividade e ajuda técnica na parte prática do trabalho.

Ao quadro docente da pós-graduação e colegas de trabalho que de alguma forma colaboraram para a realização deste empreendimento.

À Faculdade Nutrição/UFG nas pessoas das Professoras Dulce Terezinha Cunha e Nilce Campos Costa, pelas condições institucionais que permitiram a realização deste Doutorado.

Ao Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição – Região Centro Oeste, pela disponibilização de importantes recursos financeiros para a realização deste trabalho.

Às amigas e companheiras de FANUT, Estelamaris Tronco Mônego, Márcia Helena Sacchi Correia e Maria do Rosário Gondim, pelo carinhoso incentivo e amizade.

À Nilda Silva Campos, minha tia de coração, seu carinho e apoio foram constantes. Infelizmente não conseguiu esperar a conclusão deste trabalho. Obrigada por nos deixar um lindo exemplo de amor à vida e ao trabalho.

À minha afilhada Ana Luiza Freitas, por compartilhar conosco sua casa em Brasília. Obrigada pelo seu carinho e sua alegria.

À Ida Helena Francescantônio, Maria Auxiliadora Jácomo e Nilce Maria Campos Costa, minhas amigas irmãs, pela grande amizade e presença afetiva que facilitaram a superação de muitos obstáculos.

Às minhas irmãs e grandes amigas Antônia, Ana, Rosária, Cláudia e Carla, minha sogra Valdivina, meus cunhados e sobrinhos, pela nossa rica convivência familiar, estímulo e força em momentos para mim significativos.

Aos meus queridos pais Plínio e Nilma, pela oportunidade à vida e pelo porto sempre seguro.

Aos meus filhos Daniel e Letícia, com as desculpas pelos momentos de ausência e renúncias. Obrigada por fazerem parte da minha vida e tornar a minha existência mais rica e feliz.

Ao meu esposo, Sizenando Júnior, pela sua presença e amor. Obrigada por caminhar ao meu lado nesta árdua jornada.

A Deus que nos possibilita todas as realizações.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/E – Attaching and Effacing  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AP-PCR – Arbitrary Primed-Polimerase Chain Reaction  
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle  
ATCC – The American Type Culture Collection  
BFP – Bundle Forming Pilus  
CAST – Council for Agricultural Science and Technology  
CCS – Contagem de Células Somáticas  
CFAs – Antígenos de Fatores de Colonização  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
COEP – Comitê de Ética em Pesquisa  
CT – Toxina Colérica  
CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica  
DAEC – *Escherichia coli* Aderente-Difusa  
DTAs – Doenças Transmitida por Alimentos  
DVAs – Doenças Veiculadas por Alimentos  
EAEC – *E. coli* Enterogregativa  
EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético  
EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica  
EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica  
ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica  
EUA – Estados Unidos da América  
ExpEC – *Escherichia coli* Extraintestinais  
FDA – Food and Drug Administration  
kb – kilobases  
LEE – Locus of Enterocyto Effacement  
LPS – Lipopolissacarídeo  
Lt – Enterotoxina Termolábil  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MBPF – Manual de Boas Práticas de Fabricação

MDR – Multi-droga-resistência

MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis

MNEC – *Escherichia coli* Associada a Meningites

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCMSO – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional

pEAF – EPEC adherence factor plasmid

PFGE – Pulsed-field Gel Electrophoresis

PT – Pulsotipo

RAPD-PCR – Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polimerase Chain Reaction

REA – Análise por Enzimas de Restrição

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SIF – Serviço de Inspeção Federal

St – Enterotoxina Termoestável

ST – Subtipo

STEC – *Escherichia coli* Produtora de Shiga Toxina

Stx – Shiga Toxina

SVS – Serviço de Vigilância em Saúde

UFC/CFU – Unidade Formadora de Colônia/Colony Forming Unit

UPEC – *Esherichia coli* Uropatogênica

UPGMA – Unweighted-Pair Group Method Using Arithmetic Averages

VTEC – *Escherichia coli* Verotoxigênica

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	17
2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	17
2.2 <i>Escherichia coli</i>	20
<b>2.2.1 <i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC)</b>	30
<b>2.2.2 <i>E. coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)</b>	31
<b>2.2.3 <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)</b>	32
<b>2.2.4 <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)</b>	35
2.3 MASTITES	36
2.4 LEITE BOVINO	39
2.5 QUEIJO MINAS FRESCAL	43
2.6 MANIPULADOR	48
2.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	52
2.8 TIPIFICAÇÃO MICROBIANA	55
<b>2.8.1 Técnicas de tipificação microbiana</b>	57
2.8.1.1 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos – Antibiograma	60
2.8.1.2 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (PFGE)	66
<b>3 OBJETIVOS</b>	70
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	71
4.1 OBJETO DE ESTUDO	71
4.2 LOCAL DA COLHEITA DE DADOS	71
4.3 COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS	71
4.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES	72
4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	72
<b>4.5.1 Preparo das Amostras e Diluições</b>	72
<b>4.5.2 Isolamento e identificação</b>	73
<b>4.5.3 Antibiograma</b>	76
<b>4.5.4 Eletroforese em gel em campo pulsado</b>	77

4.6 ASPECTOS ÉTICOS	79
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	80
Artigo 1	108
Artigo 2	127
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	148
<b>ANEXOS</b>	152

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotipicamente, utilizando antibiograma e, genotipicamente, através da macrorrestrição de DNA (restriction fragment length polymorphism - RFLP) seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE), isolados de *Escherichia coli* obtidos a partir de amostras de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal produzidos em um laticínio em Goiás, Brasil, visando estabelecer uma possível relação de contaminação entre o manipulador e/ou a matéria-prima e o produto final. Foram coletadas 24 amostras de leite cru e de queijo Minas Frescal, 46 amostras de mãos e 46 de nasofaringe, utilizando suabes esterilizados, dos manipuladores envolvidos na fabricação do queijo, no período entre março/2004 e fevereiro/2005. *E. coli* foi isolada em 11 (12,0%) das 92 amostras dos manipuladores, em 19 (79,2%) das 24 amostras de leite cru e em 17 (70,8%) das 24 amostras de queijo. De acordo com o antibiograma, 42 dos isolados (60,9%) foram suscetíveis a todos os antibióticos testados. Isolados a partir da nasofaringe apresentaram resistência de 33,3% à cefalotina, sulfametoxazol trimetoprim e tetraciclina e nenhum apresentou resistência à ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina. Das amostras isoladas das mãos, 12,5% apresentaram resistência para cefalotina e tetraciclina e não foi observada resistência aos demais antibióticos testados. Dentre os isolados do leite cru, maior resistência (18,2%) foi encontrada para tetraciclina e nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e gentamicina. Nos do queijo, observou-se resistência (4,0%) à ampicilina, sulfametoxazol trimetoprim e tetraciclina. A partir do antibiograma, foi possível agrupar os isolados em 17 diferentes perfis fenotípicos (A–Q), porém a técnica não foi eficiente em determinar a fonte da contaminação bacteriana para os queijos. A partir do RFLP/PFGE obteve-se 61 perfis eletroforéticos diferentes evidenciando alta diversidade genética entre eles e ausência de cepas endêmicas. Comparando os perfis genotípicos dos isolados de leite e queijo observou-se que dois pulsotipos mostraram cepas indistinguíveis e três possivelmente relacionados, sugerindo que a matéria-prima possa ser provável fonte de contaminação do produto final. Quanto à comparação dos perfis obtidos de isolados de mão e queijo foi possível estabelecer somente uma possível relação de contaminação. Nenhuma cepa isolada do nariz dos manipuladores apresentou correlação com cepas isoladas do queijo ou do leite cru.

## ABSTRACT

The present study aimed to identify and to characterize phenotypic and genotypically, using antibiogram and DNA macrorestriction (restriction fragment length polymorphism – RFLP) followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) *E. coli* strains obtained from handlers hands and noses, raw milk and Minas Frescal cheese produced by a dairy milk processing plant in Goiás, Brazil, to establish possible relationships among the sources of *E. coli* and cheese. Twenty-four samples were collected from raw milk and Minas Frescal cheese, 46 from hands and 46 from noses of handlers involved in the cheese manufacturing, between March/2004 and February/2005. Sixty nine *E. coli* strains were isolated and submitted to the susceptibility test for six antimicrobials (ampicillin, cephalothin, ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim-sulphamethoxazole and tetracycline). *E. coli* was obtained from 11 (12.0%) of 92 personnel samples, from 19 (79.2%) of 24 raw milk samples and from 17 (70.8%) of 24 cheese samples. According to antibiogram 42 (60.9%) isolates were susceptible to all six antibiotics. Handler's nose isolates showed 33.3% resistance for cephalothin, trimethopim-sulphamethoxazole and tetracycline. Handler's hands isolates showed 18.5% resistance for tetracycline. Raw milk isolates showed 18.2% resistance for tetracycline and Minas Frescal cheese isolates showed 4.0% for ampicillin, trimethopim-sulphamethoxazole and tetracycline. The strains were grouped in 17 different phenotypic susceptibility profiles (A-Q). The phenotypic susceptibility profiles determined by the antibiogram method failed to establish a correlation between the strains obtained from the probable sources (handlers and milk) and the final products. Strains were compared to access the role of personnel and raw milk in the cheeses contamination. Based on RFLP/PFGE genotyping, one strain isolated from food handler's hands and five strains isolated from raw milk were identical or closely related to six strains from cheeses, suggesting in this case, as the probable source of *E. coli* contamination in cheeses. No strain isolated from the nose was related to cheeses or milk strains. The results showed high diversity among the strains, since from the 66 isolates typed generated 61 different DNA banding profiles, demonstrating a lack of predominance of an endemic clone in the dairy plant. This paper highlights the usefulness of PFGE as an epidemiological tool for determining the source of *E. coli* contamination in the food industry.

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados talvez sejam o problema de saúde mais difundido no mundo contemporâneo e uma das causas mais importantes da reduzida produtividade econômica de muitas nações. Apesar da natureza ubiqüitária dessas doenças, a segurança alimentar recebe menos atenção dos governos nacionais e de organizações internacionais que outras doenças mais dramáticas, porém menos globais (Baird-Parker 1994, Notermans & Borgdorff 1997).

Os programas de segurança alimentar devem propiciar um controle de qualidade efetivo em toda a cadeia alimentar, desde a produção, processos de manipulação, armazenagem e distribuição até o consumo do alimento *in natura* e processado (Cavalli 2001). Em uma indústria de alimentos a qualidade da matéria-prima apresenta evidente importância, mas também são relevantes as técnicas de manipulação e a própria saúde dos manipuladores na epidemiologia das doenças de origem alimentar (Moraes 1999).

Na tentativa de garantir a segurança dos alimentos nas diversas condições em que são elaborados tanto na indústria de alimentos quanto nas unidades de alimentação e nutrição, a Organização Mundial de Saúde (OMS) através do *Codex Alimentarius Commission* recomenda o uso do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), uma vez que esse método pode ser aplicado na identificação e caracterização dos pontos críticos em que ocorrem riscos e para estabelecer prioridades de intervenção e controle em todas as etapas da cadeia alimentar (Bryan et al. 1997, OMS 2003).

As doenças veiculadas por alimentos podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. As

bactérias, pela sua diversidade e patogenia constituem o grupo microbiano mais importante e amplamente associado a essas enfermidades. Existem vários gêneros e espécies bacterianas envolvidas neste mecanismo, sendo o gênero *Escherichia* incluindo a espécie *Escherichia coli* com cepas patogênicas e enterotoxigênicas um dos principais (Le Loir et al. 2003, Pinto 2004, Silva Jr. 2005).

Muitos dos fatores causais de doenças estão ligados ao processamento do leite e seus derivados e, em decorrência disto, diversos surtos têm sido relacionados à ingestão de produtos lácteos contaminados com certas bactérias, principalmente *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* (Catão & Ceballos 2001, Costa et al. 2002). A presença de *E. coli* nestes produtos pode indicar condições sanitárias que conduzem a deteriorações e perda da qualidade, com subsequente perigo a saúde pública devido ao fato de existirem linhagens patogênicas implicadas em diversos surtos epidêmicos no homem (Coia 1998).

Microrganismos enteropatogênicos têm sido encontrados no leite e em seus derivados estocados em condições inadequadas e consumidos sem tratamento térmico. A composição do leite, sua microbiota natural, a contaminação pós-pasteurização, o processamento e manipulação, os equipamentos, a temperatura inadequada durante estocagem e o transporte podem resultar em altos níveis de microrganismos patogênicos em seus derivados, entre eles os queijos, podendo explicar o fato de que freqüentemente estes estejam implicados com as doenças veiculadas por alimentos (Freitas et al. 1993, Adesiyum et al. 1998, Reibnitz et al. 1998, Araújo et al. 2002).

Para estudar as correlações entre organismos patogênicos e alimentos podem ser empregados métodos de tipificação microbiana através da

caracterização de linhagens de microrganismos, evidenciando diferenças dentro de mesma espécie. Para tanto, são utilizadas técnicas fenotípicas, baseadas na expressão das características dos microrganismos e técnicas genotípicas, baseadas na análise do DNA destes microrganismos (Arbeit 1999).

As técnicas moleculares podem ser aplicadas na mensuração dos fatores ligados ao hospedeiro, ao agente e à sua exposição. Quando aplicadas em estudos de doenças os resultados aumentam a habilidade de detectar associações de forma mais confiável. Tais estratégias ajudam a estratificar e refinar dados proporcionando mensurações mais sensíveis e específicas, as quais facilitam atividades epidemiológicas incluindo vigilância, investigações de surtos, identificação de modelos de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente desconexos, caracterizando interações hospedeiro–patógeno, detectando organismos não cultiváveis e promovendo melhor entendimento da patogênese das doenças, em nível molecular (Foxman & Riley 2001).

Estas técnicas são importantes ferramentas na investigação epidemiológica de surtos de origem alimentar, permitindo identificar a fonte da contaminação para os alimentos bem como nortear a adoção de medidas focadas nos problemas levantados, visando o controle sanitário dos alimentos, garantindo maior segurança ao consumidor (van Belkum et al. 2001).

Uma importante fonte de microrganismos para os alimentos pode ser os manipuladores envolvidos em toda a cadeia de sua produção. No entanto, com estudos de tipificação bacteriana, Tondo et al. (2000), demonstraram que a fonte de microrganismos pode ser a matéria-prima e não os manipuladores como se adotava como consenso.

Tendo em vista estas divergências, o conhecimento das fontes de *E. coli* para o queijo Minas Frescal, um produto largamente consumido no estado de

Goiás, permitiria a adoção de medidas sanitárias de produção de leite e manipulação dos seus produtos derivados com o objetivo de minimizar a contaminação final por esta bactéria.

Para melhor caracterização de cepas de *E. coli*, Arbeit (1999) recomenda a associação de técnicas fenotípicas e genotípicas (tradicionais e moleculares). Obtendo assim, resultados mais consistentes com maior sensibilidade e poder discriminatório. Acredita-se que tal investigação, possa contribuir para a construção de orientações técnicas na implantação de programas destinados ao controle higiênico-sanitário na produção de leite e derivados na região, bem como, buscar integração entre órgãos governamentais de vigilância sanitária, instituições de ensino e pesquisa na área nutrição, tecnologia de alimentos e saúde pública, setores da indústria leiteira e comercialização de produtos afins e também a população consumidora. Os resultados aqui obtidos poderão subsidiar novas atividades de pesquisa e extensão desta natureza, inclusive ações intervencionistas e preventivas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A segurança alimentar é um componente vital do perfil de qualidade de um produto. Entre os atributos de qualidade dos alimentos destaca-se a chamada qualidade sanitária, inocuidade, salubridade, ou seja, os alimentos não devem produzir enfermidade aos consumidores e nem oferecer perigo de natureza química (resíduos de pesticidas, desinfetantes, metais pesados), física (insetos, pêlos, objetos, entre outros) ou biológica (parasitas e microrganismos) (Alvarenga 1998).

No Brasil o termo “alimento seguro” é focado dentro dos programas de segurança alimentar, que devem propiciar um controle de qualidade efetivo em toda a cadeia alimentar, desde a produção, processamento, armazenagem e distribuição até o consumo do alimento *in natura* (Cavalli 2001). O código de proteção e defesa do consumidor considera como direitos básicos à proteção da vida e da saúde, a segurança contra os riscos provocados por prática de fornecimento de produtos e serviços considerados perigosos ou nocivos à saúde humana (Hiluy et al. 1996).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs), comumente conhecidas como toxinfecções alimentares, são definidas pela OMS como “doenças infecciosas ou tóxicas causadas por agentes que entram no organismo humano através dos alimentos e água” (Council for Agricultural Science and Technology – CAST 1994).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil 2001) as DTAs ou as doenças veiculadas por alimentos (DVAs), são termos

utilizados para designar a doença causada pela ingestão de microrganismos viáveis (infecção) ou toxinas produzidas por eles (intoxicações) em quantidades suficientes para o desenvolvimento de quadro patológico, tendo como agente vetor e principal porta de entrada a via oral. A sintomatologia é caracterizada por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreia, febre e dores abdominais que ocorrem individualmente ou em combinação de sintomas.

As DTAs podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, entretanto as bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem o grupo mais importante epidemiologicamente, estando implicadas em dois terços dos surtos dessas doenças, frequentemente associados com alimentos de origem animal (Pan et al. 1997, Le Loir et al. 2003, Rooney et al. 2004). Segundo Silva Jr (2005) atualmente admite-se três categorias dessas enfermidades: as toxinoses - quadro clínico conseqüente à ingestão de toxinas bacterianas pré-formadas nos alimentos, decorrente da multiplicação de bactérias toxinogênicas nestes produtos; as infecções - causadas pela ingestão de células viáveis de microrganismos patogênicos que se multiplicam no trato gastrointestinal, produzindo toxinas ou agressão ao epitélio; as toxinfecções - provocadas pela ingestão de quantidades elevadas de bactérias na forma vegetativa que liberarão toxinas no trato gastrointestinal quando esporulam, porém sem colonizar. Dependendo da susceptibilidade do hospedeiro, essas enfermidades podem se tornar severas ou levar a sérias complicações crônicas.

Um surto de DTA é definido como a ocorrência de dois ou mais casos de uma manifestação clínica semelhante, relacionados entre si no tempo e no espaço e caracterizados pela exposição comum a um alimento suspeito de conter microrganismos patogênicos, toxinas ou venenos. Na eventualidade particular de

ocorrência de botulismo, cólera ou outra patologia severa ou inusitada, a constatação de um único caso deve ser considerada como surto (Johnston 1990, Le Loir et al. 2003).

Na África, Ásia (excluindo a China) e América do Sul, as estimativas indicam que, anualmente, ocorre mais de um bilhão de casos de gastroenterites em crianças menores de cinco anos de idade e cerca de cinco milhões de mortes, sendo a maioria provocada pelo consumo de alimentos contaminados. Estudos indicam que, em muitos países europeus, ocorrem pelo menos cinquenta mil casos de gastroenterites agudas por milhão de pessoas por ano (Baird-Parker 1994). Pesquisadores calculam que aproximadamente cem milhões de indivíduos, em todos os países industrializados, contraem doenças (infecções e intoxicações) decorrentes da ingestão de alimentos. No continente americano, as gastroenterites estão entre as cinco principais causas de mortes em crianças menores de cinco anos, com uma incidência média anual de quatro episódios diarréicos por criança (Johnston 1990).

Dentre os episódios de DTAs, a contaminação microbiológica responde por mais de 90,0% das ocorrências (Winarno 1992). Anualmente nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que 76 milhões de pessoas são acometidas por doenças veiculadas por alimentos e destes 300.000 são hospitalizados e 5.000 podem chegar a óbito (Mead et al. 1999).

No Reino Unido uma média de 2,37 milhões de casos de gastroenterites ocorreu anualmente, no período de 1992 a 2000 (Adak et al. 2002).

A incidência estimada de gastroenterites, na Austrália, é de 17,2 milhões de casos por ano levando a 15.000 hospitalizações e 80 óbitos, destas, 32,0% são de origem alimentar (Hall et al. 2005).

No Brasil, segundo o Serviço de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), no período de 1999 a 2003 ocorreram 2.676 surtos de DTAs com 42.642 doentes, sendo o leite e derivados responsáveis por 123 desses episódios, entretanto 904 surtos não tiveram o alimento identificado. Em 1.134 surtos o agente etiológico não foi encontrado mas, a *E. coli* esteve envolvida em 127 dos eventos (Brasil 2006).

Mesmo considerando o grande número de casos já relatados, há estimativas de que somente uma fração destas doenças seja reconhecida e notificada como sendo de origem alimentar. A falta de notificação dos casos de DTAs às autoridades de saúde dificulta o levantamento de dados que, muitas vezes, é feito com base em registros hospitalares (Parrila-Cerrillo et al. 1993). Segundo Winarno (1992), nos países em desenvolvimento a taxa entre casos reais e os relatados pode ser tão alta quanto 100:1.

A produção de alimentos seguros está, primariamente, relacionada com ações preventivas e o declínio dos índices de surtos de DTAs refletem o sucesso dessas ações. Assim, tanto os produtores de alimentos quanto as autoridades sanitárias, têm responsabilidades de coletar, ativamente, informações necessárias quanto aos riscos de tais doenças, com o intuito de proteger o consumidor (Notermans & Borgdorff 1997).

## 2.2 *Escherichia coli*

A *E. coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, e foi descrita pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodor von Escherich em 1885. Bastonete Gram negativo classificado na família *Enterobacteriaceae*, atua predominantemente como um anaeróbio facultativo, dado seu metabolismo

respiratório e fermentativo. A maioria das cepas é móvel, possuindo flagelos peretríquios (Cardoso et al. 2001, Schroeder et al. 2004). Das cepas de *E. coli*, 90% são lactose positivas, mas algumas cepas diarreagênicas são tipicamente lactose negativas. O resultado positivo na pesquisa do indol, em 99,0% das cepas deste microrganismo, é considerado um dos melhores testes individuais para sua diferenciação em relação a outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Nataro & Kaper 1998, Food and Drug Administration – FDA 2002).

Este microrganismo pode colonizar o sistema gastrointestinal de crianças com poucas horas de vida e também permanecer confinado, como comensal, no lúmen intestinal, entretanto, em indivíduos debilitados ou imunocomprometidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, estas cepas não patogênicas podem causar infecção. Mesmo seres humanos saudáveis são suscetíveis à infecção por um dos muitos clones altamente adaptados de *E. coli*, que adquiriram atributos de virulência específicos, lhes conferindo uma grande habilidade de se ajustar a novos nichos, os quais juntos desenvolveram possibilidades de causar um amplo espectro de doenças humanas. As enfermidades causadas pelas cepas patogênicas podem ser limitadas à superfície da mucosa ou podem disseminar pelo organismo. Três síndromes clínicas resultam de infecção inerente às cepas patogênicas – infecção do trato urinário, meningite e sepse e doença entérica/diarréica (Nataro & Kaper 1998, Silva & Silva 2005).

Participante da microbiota anaeróbica facultativa do intestino humano, esta bactéria é considerada a melhor competidora neste sítio altamente colonizado por outros microrganismos. Apesar de vários relatos na literatura sobre a genética e fisiologia destas espécies, o mecanismo pelo qual a *E. coli* assegura uma excelente simbiose no cólon é pouco caracterizado. Uma hipótese interessante

sugere que essa bactéria explora sua capacidade de utilizar o gluconato mais eficientemente que outras espécies residentes. Este fato lhe permite ocupar um nicho metabólico altamente específico (Sweeney et al. 1996).

Os atributos de virulência da *E. coli* são frequentemente codificados em elementos genéticos móveis que podem ser recrutados em diferentes cepas e assim criar novas combinações desses fatores ou, em elementos genéticos que eram móveis, mas evoluíram para tornarem-se imobilizados dentro do genoma. Somente as combinações de maior sucesso de tais fatores têm persistido tornando-se patotipos (grupos patogênicos) de *E. coli* capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis (Kaper et al. 2004).

As cepas patogênicas intestinais são classificadas, de acordo com os determinantes de virulência, em seis categorias distintas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* aderente-difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro & Kaper 1998, Schroeder et al. 2004). Quanto às cepas extraintestinais, chamadas de ExPEC, as mais comuns são as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) responsáveis por infecções do trato urinário e os patotipos associados à meningites e sepse (MNEC) (Russo et al. 2000).

Anteriormente à identificação dos fatores de virulência específicos nas cepas de *E. coli* diarreagênicas, as análises sorotípicas foram as mais predominantes na diferenciação das cepas patogênicas. De acordo com o esquema modificado de Kauffman, a *E. coli* é sorotipificada com base em seu perfil antigênico de superfície, ou seja, “O” para somático, “H” flagelar e “K” capsular (Lior 1996, Nataro & Kaper 1998).

Os vários patotipos de *E. coli* tendem a ser grupos clonais caracterizados pelos antígenos O (lipopolissacárides – LPS) e H flagelar, onde somente o

antígeno O define sorogrupos e antígenos O e H definem sorotipos (Nataro & Kaper 1998). Os sorogrupos específicos de *E. coli* podem ser associados a certas síndromes clínicas, mas em geral não são os antígenos responsáveis pela virulência. Preferencialmente, os sorotipos e os sorogrupos servem como marcadores cromossomais identificáveis que correlacionam com clones de virulência específicos (Whittam et al. 1993).

As *E. coli* patogênicas utilizam um mecanismo de infecção similar ao usado por outros patógenos de mucosa, o qual consiste na colonização de um sítio da mucosa, evasão de defesas hospedeiras, multiplicação e dano ao hospedeiro. A característica mais conservada pelas *E. coli* diarreagênicas é sua habilidade de colonizar a superfície da mucosa intestinal apesar do peristaltismo e da competição por nutrientes com a microbiota nativa do intestino (incluindo outras *E. coli*) (Nataro & Kaper 1998). A maioria dessas bactérias se mantém extracelularmente, entretanto, a EIEC é um verdadeiro patógeno intracelular sendo capaz de invadir e replicar dentro das células epiteliais e macrófagos. Outras cepas também podem ser internalizadas pelas células epiteliais em baixos níveis, mas parecem não se replicar intracelularmente (Kaper et al. 2004).

Estabelecida a colonização, as estratégias de patogenicidade desses microrganismos exibem notável variedade. Os paradigmas gerais pelos quais a *E. coli* pode causar diarreia incluem a invasão (EIEC) e/ou aderência íntima à membrana (EPEC e EHEC) e a produção de toxina (EHEC, ETEC e EAEC). Entretanto a interação deste microrganismo com a mucosa intestinal é específica para cada categoria (Nataro & Kaper 1998).

#### **- Adesão e colonização**

As cepas patogênicas contam com fatores de aderência específicos que permitem sua colonização em sítios que estas normalmente não habitam como o

intestino delgado e uretra. O contato inicial da EPEC com a célula hospedeira é denominado de adesão localizada. Há evidências que indicam que esse contato é mediado por fímbrias tipo IV, ou seja, estruturas filamentosas de 4 a 7 nanômetros (nm) de diâmetro, expressas na superfície bacteriana que se agregam formando feixes, e denominadas *bundle forming pilus* (BFP) (Girón et al. 1991, Kaper et al. 2004). Estudos demonstram que BFP é um importante fator de virulência de EPEC (Bieber et al. 1998), tendo um conglomerado de 14 genes que o codificam em um plasmídeo denominado *EPEC adherence factor plasmid* (pEAF) (Sohel et al. 1996, Stone et al. 1996).

Após o estabelecimento da aderência localizada entre a EPEC e a célula alvo, acontece a lesão celular de patogenicidade da infecção, denominada *attaching and effacing* (A/E). Assim que esse microrganismo adere à superfície da célula epitelial, o BFP sofre profundas modificações estruturais promovendo a agregação das bactérias entre si e organizando microcolônias sobre a célula hospedeira. Ocorre assim uma aderência íntima da bactéria à superfície dessas células, seguida da destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação polarizada de moléculas de  $\alpha$ -actina, talina e ezrina, bem como de outros componentes do citoesqueleto situados abaixo do sítio de adesão (Silva & Silva 2005). Este mecanismo também foi observado em outras espécies bacterianas (Nataro & Kaper 1998).

Na patogênese da lesão A/E, a EPEC expressa outro grupo de fatores de virulência codificado por genes localizados numa ilha de patogenicidade conhecida como *locus of enterocyte effacement* (LEE) presente numa região cromossômica específica. LEE contém genes codificantes de proteínas como: reguladores transcricionais; translocadores; chaperonas moleculares; proteínas efetoras, incluindo a intimina (codificada pelo gene *eae* e expressa na membrana

externa da bactéria) e o seu receptor translocado – Tir (Dean et al. 2005, Silva & Silva 2005). A interação intimina-Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira iniciando processos de sinalização celular e reorganização de componentes do citoesqueleto para formação do pedestal (Goosney et al. 2000). Esse pedestal exerce papel efetivo na firme adesão da EPEC à superfície da célula hospedeira, sendo uma estratégia desenvolvida pela bactéria para permanecer no ambiente extracelular e não ser internalizada se, eventualmente, aderir à superfície de fagócitos profissionais (Goosney et al. 1999, Kenny et al. 1997).

#### **- Produção de toxinas**

As diferentes cepas de ETEC colonizam a superfície da mucosa do intestino delgado e elaboram pelo menos um dos membros dos grupos definidos de enterotoxinas como a enterotoxina termo-lábil (Lt) e a termo-estável (St) “a” e “b” (Sta e Stb), levando à secreção de íons aumentando a concentração de importantes mensageiros intracelulares tais como o AMP cíclico (cAMP), GMP cíclico (cGMP) e  $Ca^{2+}$ . A diarreia pode ser causada pela ação isolada de Lt ou St ou da combinação de ambas (Sears & Kaper 1996, Nataro & Kaper 1998).

As Lts são toxinas oligoméricas fortemente relacionadas (80,0% de identidade), em estrutura e função, à enterotoxina colérica (Ct), expressa pelo *Vibrio cholerae*. Lt e Ct compartilham características como a seqüência de proteínas, atividade enzimática e testes de atividade em cultura animal e celular (Sixma et al. 1993). Algumas diferenças são observadas no processamento e secreção da toxina e na resposta ao linfócito T *helper* (Dickinson & Clements 1995). Existem dois grupos maiores de Lt, Lt-I e Lt-II, os quais não fazem reação cruzada imunologicamente. Lt-I é expressa por cepas patogênicas para animais e humanos. Lt-II é encontrada primariamente em *E. coli* isoladas de animais e

raramente naquelas isoladas de humanos e não tem sido associada à doença nem em animais quanto em humanos. São codificadas pelos genes *elt* ou *etx* localizados em plasmídios que também podem conter genes codificantes de St e/ou antígenos de fatores de colonização (CFAs) (Nataro & Kaper 1998).

Quando a ETEC se liga às células hospedeiras, a toxina é endocitada e translocada na célula pelo sistema trans-Golgi vesicular. O alvo da Lt-I é a adenilato ciclase localizada na membrana basolateral das células epiteliais intestinais polarizadas, onde ocorre sua permanente ativação, desencadeando aumento nos níveis de cAMP intracelularmente, seguida de intensa fosforilação dos canais clorídricos na membrana de células epiteliais apicais. Esta rede resulta na estimulação de secreção íons Cl<sup>-</sup> e na inibição da absorção de NaCl. A alta concentração de íons no lúmen intestinal retira água provocando diarreia osmótica (Sears & Kaper 1996, Nataro & Kaper 1998).

As Sts são toxinas monoméricas com múltiplos resíduos de cisteína com os quais formam pontes de dissulfeto que explicam a sua termoestabilidade. As duas classes (Sta e Stb) não se relacionam, diferindo em estrutura e mecanismo de ação. Os genes que codificam ambas as classes são encontrados, predominantemente, em plasmídios sendo alguns achados em transposons. A Sta ou St-I é produzida pela ETEC e outras bactérias Gram-negativas (*Yersinia enterocolitica* e *V. cholerae* não-O1). Sta apresenta 50,0% de identidade protéica com a St da EAEC e Stb tem sido encontrada somente em cepas de ETEC (Savarino et al 1996, Yamamoto & Echeverria 1996).

Sta é inicialmente produzida como um precursor de aminoácido sendo clivada e transportada, através do periplasma, onde as pontes de dissulfeto são formadas por proteínas DsbA codificadas cromossomalmente. A Sta é maturada por um processo de proteinase não bem conhecido e assim, é liberada por

difusão, através da membrana externa. Esta toxina liga-se a enzima guanilato ciclase C (GC-C), localizada na membrana apical das células epiteliais intestinais, estimulando sua atividade e promovendo um aumento no nível intracelular de cGMP que estimula a secreção de cloro e/ou a inibição da absorção de NaCl resultando um quadro de secreção fluida em nível intestinal (Crane et al. 1992, Mezolf et al. 1996, Sears & Kaper 1996).

O mecanismo de ação da Stb, ainda pouco elucidado, envolve danos histológicos no epitélio intestinal consistindo de perda de células epiteliais e atrofia parcial das vilosidades. O receptor para esta toxina é desconhecido, todavia estudos relatam que Stb pode se ligar, inespecificamente, à membrana plasmática antes da sua endocitose (Chao & Dreyfus 1997). Diferentemente da Sta, a Stb estimula a secreção de bicarbonato pelas células intestinais. Esta toxina não aumenta a concentração intracelular de cAMP e cGMP, embora possa aumentar níveis intracelulares de cálcio através de fontes extracelulares (Sears & Kaper 1996).

O maior fator de virulência para EHEC é uma potente citotoxina que leva ao desenvolvimento de vários sintomas e até a óbito em pacientes infectados com este patotipo. O termo *E. coli* verotoxigênica ou produtora de Vero-toxina (VTEC) partiu de observação realizada por Konowalchuk et al. (1977), onde cepas deste microrganismo produziram efeito citopático irreversível em células Vero cultivadas, diferentemente dos efeitos não citopáticos provocados pela ETEC Lt. Na mesma ocasião, O'Brien et al. (1982) relataram que extratos de certas cepas de *E. coli*, eram citotóxicos para células HeLa e que esta atividade poderia ser neutralizada por um antitoxina preparada contra a toxina da *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxina - Stx), assim foram chamadas de *E. coli* produtoras de Shiga-toxina (STEC). Estudos subseqüentes reportaram que muitas cepas de *E. coli* isoladas

de doenças diarréicas produziam toxina semelhante à Stx, incluindo uma das cepas produtoras de Vero citotoxina (O'Brien et al. 1982), sugerindo que ambas eram idênticas, com fator de virulência comum à colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica, causadoras de danos em tecido intestinal e renal e produzidas pelo sorotipo O157:H7. Portanto, dentro da comunidade científica os termos STEC e VTEC são equivalentes e se referem às cepas de *E. coli* produtoras de uma ou mais toxinas do grupo Stx (Nataro & Kaper 1998).

A família Stx contém dois subgrupos: Stx1, que apresenta grande homologia de aminoácidos em relação à Shiga-toxina produzida pela *S. dysenteriae*, não sendo distinguível desta sorologicamente, e a Stx2 que é menos relacionada à Shiga-toxina e também não é neutralizada pelos anticorpos da Stx1 e da Shiga-toxina (Boerlin et al. 1999). Stx é produzida no cólon seguindo através da corrente sanguínea até o rim onde provoca danos às células epiteliais renais obstruindo a microvascularização resultando em inflamação renal. Este dano pode levar à síndrome urêmica hemolítica, caracterizada pela anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda potencialmente fatal. Stx também induz apoptose em células epiteliais do intestino, causa danos locais no cólon resultando em diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal. Esta síndrome pode ser causada também pela *S. dysenteriae* embora não possa ser causada por outras espécies de *Shigella* ou EIEC por não produzirem Stx (Kaper et al. 2004).

Além da Stx a maioria das cepas EHEC também apresenta ilha de patogenicidade LEE que codifica proteínas efetoras homólogas às produzidas pela EPEC. Estudos em animais têm mostrado a importância da intimina na colonização intestinal e pacientes com síndrome urêmica hemolítica respondem com anticorpos a esta adesina e a outras proteínas codificadas pelo LEE.

Acredita-se que a EHEC O157:H7 evoluiu de cepas EPEC O55 que adquiriram bacteriófagos que codificam Stx. Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* possam produzir Stx, a maioria destes não possui LEE e não estão associados à doença humana. Assim a terminologia STEC e VTEC é usada para qualquer cepa de *E. coli* que produza Stx e o termo EHEC envolveria somente as cepas Stx positivas e que apresentam LEE (Reid et al. 2000, Kaper et al. 2004).

A versatilidade do genoma da *E. coli* é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídios ligados à virulência e ilhas de patogenicidade cromossomais. As cepas EIEC, EHEC, EAEC e EPEC tipicamente abrigam famílias de plasmídios altamente conservadas, cada uma codificando múltiplos fatores de virulência (Wood et al. 1986, Nataro et al. 1987, Hales et al. 1992). McDaniel e Kaper (1997) mostraram que os genes de virulência cromossomais da EPEC e EHEC são organizados em cluster referido como uma ilha de patogenicidade. Tais ilhas podem representar uma forma nas quais os genomas de cepas patogênicas e não patogênicas divergem geneticamente. Embora plasmídios e ilhas de patogenicidade carreguem genes de virulência, traços individuais podem ser codificados por transposons (como o St) ou codificados por fagos (como as Stx) (O'Brien et al. 1992).

Ao longo do século 20, vários surtos de infecção por *E. coli* têm ocorrido em todo o mundo, sendo veiculados por muitos alimentos como queijo, salmão, iogurte, vegetais, frutas, produtos manipulados e principalmente a carne processada, em vários locais incluindo restaurantes, cantinas escolares, casas de saúde e na comunidade (Schroeder et al. 2004).

Embora a *E. coli* seja um habitante comum do trato intestinal do homem e de animais, cepas patogênicas ocupam o segundo lugar entre os principais agentes de DTAs nos EUA, respondendo por 7,4% dos surtos e 28,6% das

mortes provocadas por bactérias no país (Olsen et al. 2000). Estima-se que anualmente nos EUA, cepas produtoras ou não de Shiga toxina (STEC) causem, aproximadamente, 94.000 e 79.000 casos de doenças respectivamente (Mead et al. 1999) e, na Austrália no ano de 2000, tais cepas foram responsáveis por 36,0% das DTAs registradas (Hall et al. 2005).

A presença de *E. coli* patogênica em alimentos e água apresenta um significativo problema em saúde pública. A transmissão de elementos de virulência entre as *E. coli* contribuem para o aumento de sua patogenicidade e diversidade (Donnenberg & Whittam 2001). Sendo um microrganismo muito dinâmico, possui capacidade de transferência horizontal de genes que aumenta sua diversidade genética e, sob certas circunstâncias, este fato pode levar à emergência de novas cepas patogênicas (Donnenberg & Whittam 2001, Maldonado et al. 2005). Podendo também transferir genes de resistência a outras bactérias (Zhao et al. 2001), assim, elas são importantes na disseminação de resistência antimicrobiana entre a microbiota intestinal e para outros patógenos relacionados a alimentos (Schroeder et al. 2003).

A vigilância continuada de perfis de susceptibilidade antimicrobiana de patógenos contaminantes de alimentos, incluindo a *E. coli*, tem sido recomendada para identificação de fenótipos antibiótico-resistentes emergentes dentro da cadeia de produção de alimentos (OMS 1997).

### **2.2.1 *E. coli* Enteropatogênica (EPEC)**

Em 1945, no Reino Unido, foi descrito um grande surto de diarreia infantil causada por cepas de *E. coli* sorologicamente distintas de cepas isoladas de crianças saudáveis. Este foi o primeiro patotipo de *E. coli* identificado sendo

denominado EPEC (Nataro & Kaper 1998). A partir dos anos 60, a EPEC teve sua importância diminuída como causa de diarreia em países desenvolvidos, permanecendo, contudo, como um dos principais agentes de diarreia na infância em áreas da América do Sul, África e Ásia. Surtos de EPEC são esporádicos e sua incidência é variável em todo mundo, despontando em locais com condições sanitárias precárias (DTA/Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE 2000). Diarreias causadas por estas cepas, em geral, são mais severas do que as causadas por outros patógenos, com prevalência de óbitos superior a 50,0%. Estima-se que no Brasil, as diarreias provocam mais de 200.000 óbitos anuais de crianças, nos quais a EPEC se encontra entre as principais etiologias (Silva & Silva 2005).

O principal reservatório de EPEC é o homem, porém, bovinos e suínos podem apresentar essa bactéria em sua microbiota intestinal normal. A via de transmissão é fecal-oral e/ou através de mãos, objetos e alimentos contaminados com fezes. Carne crua e frango são os alimentos mais comumente implicados em surtos por EPEC, embora qualquer alimento exposto à contaminação fecal possa ser suspeito (DTA/CVE 2000). Cepas deste patotipo de *E. coli* têm sido isoladas em alimentos armazenados em temperatura de refrigeração, entre eles produtos lácteos (Bottone 1997). Em estudo realizado no Rio de Janeiro, Gonzalez et al. (2000) isolaram cepas de EPEC em amostras de queijo Minas Frescal e frango.

### **2.2.2 *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC)**

As cepas de ETEC foram reconhecidas como causadoras de doenças diarreicas em suínos, com infecções letais em animais neonatos. Os primeiros relatos de ETEC em humanos reportaram isolados de *E. coli* em fezes de

crianças com diarreia com secreção fluida (Nataro & Kaper 1998). Clinicamente os indivíduos desenvolvem diarreia líquida, dor abdominal, febre baixa, náusea e mal-estar. A doença é usualmente autolimitada, durando não mais que cinco dias. Contudo, quando ocorre em crianças e idosos debilitados, a doença é mais severa exigindo reposição hidroeletrólítica (DTA/CVE 2000).

Estes microrganismos estão associados a duas grandes síndromes clínicas: a diarreia em crianças pós-desmame em países em desenvolvimento, com porcentagem de casos endêmicos variando de 10,0 a 30,0%, e a diarreia do viajante entre adultos visitantes de áreas endêmicas, podendo chegar a 40,0% dos casos. Cepas produtoras de St causam a maioria dos casos endêmicos (Nataro & Kaper 1998).

Os humanos constituem seu reservatório natural e seu período de incubação de 10-12 horas tem sido observado em surtos e em estudos com voluntários. Investigações epidemiológicas têm implicado alimentos e água contaminados como veículos dessas infecções, principalmente em meses quentes e úmidos quando a multiplicação desses organismos é mais eficiente (Levine 1987, Nataro & Kaper 1998). A ETEC não é considerada uma doença transmitida por alimentos grave em países com adequado padrão sanitário e boas práticas de preparação dos alimentos (DTA/CVE 2000).

### **2.2.3 *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

EHEC é um patógeno emergente que tem estimulado grande interesse mundial em muitos surtos de DTAs. A maioria dos casos é decorrente da ingestão de alimentos contaminados, particularmente de origem animal. Surtos de enfermidades e casos esporádicos em humanos têm sido associados a esse patótipo, com alta prevalência em nações desenvolvidas, como na Alemanha

(Beutin et al. 1993), Austrália (Cobbold & Desmarchelier 2000, Bettelheim et al. 2005, Hall et al. 2005), Canadá (Boerlin et al. 1999), Espanha (Blanco et al. 1996, 2003), EUA (Maldonado et al. 2005, Rangel et al. 2005), Japão (Sakuma et al. 2006) e Reino Unido (Coia et al. 2001).

Os dados disponíveis no Brasil pontuam uma baixa incidência da EHEC em doenças humanas (Giraldi et al. 1990, Guth et al. 1994, Rosa et al. 1998). Entretanto, estudos conduzidos no Rio de Janeiro, por Cerqueira et al. (1999), evidenciaram alta ocorrência em animais saudáveis em fazendas de gado leiteiro e de corte, sugerindo a necessidade de estratégias eficientes de controle e prevenção de contaminação em produtos de origem animal.

Esta bactéria pode contaminar alimentos em uma variedade de rotas, incluindo a ruptura do intestino durante a evisceração no abate de animais, contaminação indireta com água poluída, manipulação e empacotamento de produtos finais (Jackson et al. 2001). Estima-se que nos EUA alimentos contaminados tenham sido os responsáveis por 110.220 casos de infecções causadas por EHEC e 158.440 casos de infecção causados por outras cepas de *E. coli* (Mead et al. 1999). A transmissão ocorre através do consumo de carne mal cozida, produtos a base de leite não pasteurizado, vegetais e água contaminada com fezes de animais, uma vez que estas cepas fazem parte da microbiota normal do intestino de animais. A transmissão inter-pessoal e de animal a pessoa, também têm sido documentada (Blanco et al. 2003, Picozzi et al. 2005).

Cepas EHEC elaboram duas potentes citotoxinas Stx1 e Stx2 codificadas por fagos, mas contam também com outros fatores associados à virulência, como a proteína intimina, que exerce um importante papel na lesão A/E na mucosa intestinal e a enterohemolisina chamada de EHEC-HlyA codificada pelo gene *ehxA* localizado no plasmídeo pO157. Bactérias dessas cepas causam diarreia

sanguinolenta, colite hemorrágica ou não, e síndrome urêmica em todos os grupos de idade, contudo jovens e idosos são mais suscetíveis (Kaper 1998).

O sorotipo mais importante é o O157:H7, responsável por vários surtos e casos esporádicos dessas patologias na América do Norte, Europa e Japão (Kaper 1998, Mead & Griffin 1998, Boerlin et al. 1999, Blanco et al. 2003, Maldonado et al. 2005). Foi identificado, pela primeira vez, como causa de enfermidade nos EUA em 1982 (Riley et al. 1983) durante um surto de diarreia sanguinolenta severa, tendo sido isolada de carne de hambúrguer contaminada. Desde então, a maioria das infecções descritas é proveniente da ingestão de carne moída mal cozida, porém, a ingestão de leite cru também tem sido associada a surtos, através da contaminação do úbere das vacas ou dos equipamentos de ordenha com conteúdo fecal.

Em países desenvolvidos o isolamento destas cepas em leite cru tem variado de 0,0 a 10,0% e de cepas STEC não O157 índices mais altos, de 1,0 a 40,0% (DTA/CVE 2000, Mainil & Daube 2005). STEC não O157 são as mais prevalentes em animais e em alimentos contaminados, provavelmente, os humanos estejam mais expostos a estas cepas (Blanco et al. 2003).

*E. coli* O157:H7, tida como uma bactéria emergente, causa um quadro agudo de colite hemorrágica, através da produção de grande quantidade de toxina, provocando grave dano à mucosa intestinal. O quadro clínico associado a ela é caracterizado por cólicas abdominais intensas e diarreia, inicialmente líquida, mas que se torna hemorrágica na maioria dos pacientes. Ocasionalmente ocorrem vômitos e a febre é baixa ou ausente. Alguns indivíduos apresentam somente diarreia líquida. Essa doença é autolimitada, com duração de cinco a dez dias. Aproximadamente 15,0% dessas infecções, especialmente em crianças

menores de cinco anos e idosos, podem apresentar a síndrome urêmica hemolítica (Nataro & Kaper 1998).

Embora essa síndrome possa ser causada por outros patógenos, nos EUA, a maioria dos casos se deve à infecção pela cepa O157:H7 onde ela é também a principal causa da falência renal aguda em crianças. Estima-se a ocorrência de 73.000 casos de infecção, 2.100 hospitalizações e 61 casos fatais (letalidade de 3,0% a 5,0%), anualmente naquele país. Na Argentina a síndrome urêmica hemolítica em crianças menores de cinco anos é endêmica, contudo não há estudos que estabeleçam ainda uma nítida relação entre essa doença, a bactéria e os alimentos, neste país. No Brasil, não há dados sistemáticos que possam indicar a situação desta síndrome entre nós. No Estado de São Paulo, estudos vêm sendo conduzidos para determinar a situação desta como também para estabelecer um ponto de partida para a introdução do sistema de vigilância da bactéria e da síndrome urêmica hemolítica (DTA/CVE 2000).

#### **2.2.4 *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Cepas de EIEC causam uma doença inflamatória da mucosa intestinal e da submucosa com um quadro de diarreia líquida, dor abdominal grave, vômitos, tenesmo, cefaléia, febre, calafrios e mal-estar generalizado, semelhante ao produzido pela *Shigella*. Em menos de 10,0% de pacientes ela evolui para fezes com sangue e muco. Contudo, uma seqüela comum associada a essa infecção, especialmente em crianças, é a síndrome urêmica hemolítica caracterizada por destruição das células vermelhas do sangue e falência renal que pode ser acompanhada de deterioração neurológica e insuficiência renal crônica (DTA/CVE 2000).

As infecções por EIEC são endêmicas nos países menos desenvolvidos e responsáveis por 1,0 a 5,0% dos episódios diarréicos dentre os que procuraram atendimento médico. Existem evidências de que a transmissão é feita através de alimentos contaminados. São desconhecidos alimentos que podem abrigar a EIEC, mas qualquer produto contaminado com fezes humanas de indivíduo doente, seja diretamente ou via água contaminada, pode causar doença em outras pessoas. Hambúrguer e leite não pasteurizado têm sido associados a surtos por EIEC (FDA 2000).

### 2.3 MASTITES

A mastite bovina é uma doença multifatorial, resultante da interação entre agente, hospedeiro e meio ambiente, incluindo os determinantes humanos e dos hospedeiros. Diversos microrganismos podem estar implicados nesta doença, assim como várias formas de infecção podem veicular e disseminar estes agentes (Almeida et al. 2005).

A mastite está entre as doenças de maior importância nos sistemas de exploração pecuária que afeta acentuadamente, do ponto de vista econômico, a produção leiteira mundial e a indústria de laticínios, seja pela redução na capacidade produtora dos rebanhos infectados (Silva 1999), como pela queda na qualidade do produto final com diminuição do rendimento industrial para fabricação de derivados (Berthelot & Bergonier 1993). Quanto à saúde pública, deve-se considerar a transmissão de agentes infecciosos ao homem a partir de leite contaminado ou, ainda, por determinarem toxemia grave como as causadas por estafilococos ou por constituírem importantes zoonoses (Almeida et al. 2005).

De acordo com Benedetti e Pedroso (1996), a obtenção higiênica do leite e a preservação da saúde do úbere, constitui um sério problema na maioria das granjas leiteiras. A adoção de novas ordenhadeiras, modernos estábulos e/ou salas de ordenha e alimentação diversificada podem ter alterado a etiologia das mastites e também os mecanismos biológicos inerentes ao animal.

A interferência da mastite sobre a qualidade do leite ocorre, principalmente pela redução de teores de lactose, gordura e caseína. Há ainda a correlação entre a alta contagem de células somáticas (CCS) e características como a viscosidade, valores de pH, ponto de congelamento e capacidade tamponante. Quando o número de CCS está aumentado, o tempo de coagulação é retardado, levando a diferenças essenciais na fase primária deste processo na fabricação de queijo. Mudança do teor de proteína, peso do queijo e conteúdos sólidos são também observados, e isto não pode ser corrigido nem mesmo pela pasteurização ou centrifugação. O leite com alta CCS apresenta diferentes propriedades sensoriais, pois o teor de cloretos é aumentado e o de lactose é reduzido, proporcionando uma vida de prateleira mais curta e sabor rançoso, pela presença de ácidos graxos livres (Brito & Charles 1995).

Segundo Martin et al. (2002), a mastite bovina é considerada uma das mais importantes doenças bacterianas em gado leiteiro em todo mundo. Muitos fatores podem influenciar o desenvolvimento de enfermidade, entretanto a inflamação da glândula mamária é usualmente consequência da invasão e colonização no tecido secretório por um ou mais patógenos de mastite tais como o *S. aureus*, *Streptococcus uberis* ou a *E. coli*.

A mastite causada por *E. coli* pode provocar considerável perda econômica no rebanho leiteiro indicada pela baixa produção e qualidade do leite, custo de tratamento e, ocasionalmente, a morte de animais. A importância de mastite

causada por este patógeno *está* no aumento de sua incidência e na severidade dos sintomas (Fang & Pyorala 1996).

Embora a *E. coli* seja um habitante normal do trato intestinal do animal, algumas cepas toxigênicas estão associadas com diarreia em gado e humanos (Lira et al. 2004), além disso, as cepas envolvidas em mastite bovina podem ser um reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, podendo disseminá-los a outras bactérias patogênicas e comensais nos locais de produção de leite (Srinivasan et al. 2004).

Estudos realizados em diferentes países têm demonstrado que 10,0 a 80,0% do gado podem carregar mais de 100 diferentes sorotipos de *E. coli* toxigênica (Wells et al. 1991, Beutin et al. 1993, Blanco et al. 1996, Wieler et al. 1996, Holland et al. 1999, Cobbold & Desmarchelier 2000, Wani et al. 2003). Beutin e Muller (1998) examinaram 41 isolados de *E. coli* obtidas de gado bovino, na Alemanha em 1965 e verificaram que isolados produtores de Stx e com marcadores de virulência STEC-associados já estavam presentes na população de gado há 30 anos antes.

No Brasil, Cerqueira et al. (1999), isolaram cepas toxigênicas de *E. coli* em gado saudável, enquanto que Lira et al. (2004) as isolaram em amostras de leite de gado com mastite. Estes últimos realizaram um estudo em sete estados, no período de março de 1997 a agosto de 1998, encontrando marcadores de virulência em 50,0% dos isolados, como a seqüência de genes *eae*, responsável pelas lesões A/E, presente nos sorotipos enterohemorrágicos da maioria das cepas de STEC humanas (Gannon et al. 1993).

Constantemente, são sugeridas novas medidas de tratamento e manejo para se evitar ou controlar a mastite. Uma delas é a ampla utilização de

antibióticos. Tal prática, entretanto pode ocasionar a ocorrência de resíduos destes medicamentos no leite (Medeiros et al. 2004).

Vários fatores que predisõem a ocorrência de mastite, relacionadas ao agente, ao hospedeiro e ao meio ambiente podem ser apontados. No entanto, os fatores que levam o homem a adotar determinadas medidas para a propriedade, o conhecimento sobre o assunto, assim como a utilização adequada dos métodos disponíveis para a prevenção e tratamento desta enfermidade, bem como a interferência destes fatores no diagnóstico de rebanhos infectados, não são ainda bem determinados (Almeida et al. 2005).

## 2.4 LEITE BOVINO

A estreita relação entre o consumo de leite e seus derivados e a melhoria da qualidade de vida é sistematicamente defendida por pesquisadores em todo o mundo. O leite e seus derivados têm sido usados como alimento para o homem desde o início da civilização. Esse produto apresenta um elevado valor biológico, sendo fonte de proteínas, vitaminas, minerais e calorias necessárias e indispensáveis ao ser humano. Além de estar presente na alimentação de todas as classes sociais e grupos etários, principalmente na dieta de crianças e idosos, também se registra que, em populações com elevada expectativa de vida, o consumo de produtos lácteos ocorre em larga escala (Afonso Neto 1984, Garrido et al. 2001).

A ingesta de leite por pessoa recomendada pela OMS é de 171 litros/ano. No Brasil o Ministério da Saúde indica o consumo de 200 litros/ano. Em 2005 consumo per capita no país, esteve abaixo da recomendação, com cerca de 137

litros ingeridos por habitante (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA 2005a, Krug 2006, MS 2006).

Segundo dados da EMBRAPA (2005a), no ano de 2005 foram produzidos no mundo cerca de 530 bilhões de litros de leite de vaca. Neste mesmo ano, o Brasil ocupou a sétima posição, sendo responsável por 4,4% da produção mundial, ou seja, aproximadamente 24 bilhões de litros. O Estado de Goiás ocupa o segundo lugar no *ranking* da produção de leite do país, com uma estimativa de dois bilhões e meio de litros anuais. A indústria leiteira processa em torno de 60,0% do total de leite produzido no país, sendo o restante consumido diretamente pelo mercado informal sem qualquer processamento industrial e sem qualquer fiscalização higiênico-físico ou sanitária oficial (Panorama do leite no Brasil 1997, Panetta 2000).

O tema qualidade do leite é bastante complexo dado à diversidade do sistema de produção nas propriedades e produtores. No Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, que vem sendo implantado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 51 de 18.09.2002, dentre inúmeros aspectos considerados, destacam-se os físico-químicos, sensoriais e microbiológicos (Brasil 2002). Desses fatores, a qualidade microbiológica é fundamental como indicativo de saúde do rebanho e da higiene praticada na propriedade, determinando assim o potencial nutricional do leite e a segurança do produto. Assim, a refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, é exigida visando diminuir a multiplicação de bactérias que causam a sua deterioração (Fagundes et al. 2006).

Devido à sua composição química, o leite é considerado um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários microrganismos (Doyle et al. 1997, Chye et al. 2004). Assim que deixa o úbere da vaca, durante a

sua ordenha, o leite entra em contato com microrganismos contaminantes. Tal contaminação varia do ponto de vista qualitativo e quantitativo, na dependência de condições climáticas da região, da higiene do manipulador, do ambiente e dos utensílios e equipamentos utilizados no processo (Zadoks et al. 2002, Carlos et al. 2004). Portanto, este produto deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a sua obtenção até o beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas, microbiológicas e nutricionais (Bonfoh et al. 2003, Feniman et al. 2003).

A obtenção e o armazenamento do leite, por outro lado, estão diretamente relacionados com a qualidade microbiológica determinando, inclusive, o seu prazo de vida útil. A preocupação com suas características microbiológicas vem crescendo em importância, já que patógenos no leite, além de provocarem alterações como degradação de gorduras, proteínas ou de carboidratos, podem torná-lo um veículo de doenças, uma vez que incluem cepas patogênicas (Hoffmann et al. 1999).

Muitos microrganismos enteropatogênicos têm sido encontrados no leite e em seus derivados estocados em temperaturas inadequadas de refrigeração e consumidos sem qualquer tratamento térmico. A composição do leite, sua microbiota natural, a contaminação pós-pasteurização, o processamento e manipulação, os equipamentos, a temperatura inadequada durante estocagem e o transporte podem resultar em altos níveis de microrganismos patogênicos em seus derivados, entre eles os queijos, podendo explicar o fato de que freqüentemente estes estejam implicados com as DTAs (Freitas et al. 1993, Adesiyum et al. 1998, Reibnitz et al. 1998, Araújo et al. 2002).

De acordo com De Busyer et al. (2001), é difícil estimar a proporção de doenças transmitidas por leite e subprodutos, devido às limitações dos sistemas

de vigilância. Na França, o leite e os seus derivados estiveram associados em cinco por cento dos 3.839 surtos de DTAs de origem bacteriana entre 1988 e 1997, e de 60 surtos relatados, 48,0% foram relacionados ao leite cru. Enquanto em outros países como Escócia, Inglaterra e País de Gales (Cowden et al. 1995, Ammon 1997), Estados Unidos (Bean et al. 1997) e Holanda (Simone et al. 1997) de um a cinco por cento do total de surtos de DTAs relatados foram relacionados a leite sem qualquer tratamento térmico.

Chye et al. (2004) isolaram *E. coli* em 64,0% das amostras de leite cru em 360 fazendas leiteiras na Península da Malásia, sugerindo que o leite pode ter sido contaminado pelos manipuladores infectados, devido as práticas de higiene inadequadas e pela água contaminada com dejetos humanos. Segundo estes autores, embora a importância global da *E. coli* como agente causador de doenças diarreicas tem diminuído nos últimos 50 anos em função da implementação de práticas sanitárias, este patógeno ainda é o maior causador de enfermidades em nações subdesenvolvidas.

Em estudo realizado por Catão e Ceballos (2001) em uma usina de beneficiamento de leite na cidade de Campina Grande/PB, amostras de leite cru, obtidas de todos os produtores, apresentou elevada contagem de coliformes totais, coliformes fecais e presença de *E. coli*. Esses autores ressaltam que na legislação brasileira não há registro de valores limites para *E. coli* que permitam avaliar o grau de contaminação do leite por este microrganismo. Deve-se considerar que as tendências mais modernas sobre o emprego de bactérias indicadoras de contaminação fecal sugerem este patógeno como o indicador mais específico, pois seria o único membro do grupo de coliformes de origem exclusivamente fecal (Garboggini & Gallo 1998).

## 2.5 QUEIJO MINAS FRESCAL

O queijo é um importante derivado do leite, apreciado tanto pelo seu valor nutricional como pelo seu sabor, que atende aos mais exigentes paladares (Raimundo 1992). No Brasil só em 2004, foram produzidas 28.875 toneladas com aumento na produção de 11,5% nos últimos quatro anos (EMBRAPA 2005b). Dentre os diversos tipos de queijos fabricados no país, o Minas Frescal tem ampla aceitação comercial e, em função de seu preço relativamente acessível, chegou a condição de terceiro queijo mais consumido pela população brasileira (Barros et al. 2004), fazendo parte do hábito alimentar nos diversos estados do país (Loguercio & Aleixo 2001, Almeida Filho et al. 2002, Câmara et al. 2002, Cardoso & Araújo 2004, Roos et al. 2005).

O Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade do Queijo (Brasil 1996) define o queijo Minas como aquele obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, completada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. O queijo Minas Frescal é um queijo branco, semelhante ao “Queso Blanco”, fabricado em outros países da América Latina, produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, caracterizado por alta atividade de água, baixo pH (5,1–5,6) e 1,0 a 6,0% de NaCl (Freitas et al. 1993). Possui cerca de 43,0% a 55,0% de umidade e uma vida de prateleira de 10 a 14 dias (Gonzalez et al. 2000). Na sua fabricação é utilizado o coalho enzimático ou químico, a remoção do soro, a moldagem e a salga (Araújo et al. 2002).

Em algumas regiões, esse produto é denominado de “queijo colonial” ou “queijo de colônia”, existindo várias indústrias, principalmente de pequeno porte, que produzem queijos coloniais de fabricação simples e baixo custo. Eles

representam a maior parte dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias. Na maioria das vezes são comercializados em embalagem plástica comum e sem tratamento à vácuo. Geralmente, é fabricado a partir de leite cru, contrariando o artigo 200 do Regulamento do Serviço de Inspeção Federal (SIF), onde consta que: “só é permitida a fabricação de queijos frescos e moles a partir de leite pasteurizado”. Fato este preocupante, pois o leite cru constitui via de transmissão para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas, como: *Mycobacterium* spp, *Brucella* spp, *Coxiella burnetti*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *E. coli* (Reibnitz et al. 1998, Ritter et al. 2001, Câmara et al. 2002, Kottwitz & Guimarães 2003, Roos et al. 2005).

A ANVISA/MS, através da Resolução RDC nº 12 de 21.01.2001 (Brasil 2001), estabelece os seguintes padrões microbiológicos aceitáveis para o queijo Minas Frescal: contagens de  $5 \times 10^3$  para coliformes/g a 45°C e  $10^3$  para estafilococos coagulase positiva/g, ausência de *Salmonella* sp e ausência de *Listeria monocytogens* em 25g do produto. No entanto, as condições de processamento, armazenamento e comercialização podem comprometer suas características sensoriais, bem como torná-lo impróprio para o consumo, em virtude da contaminação por microrganismos (Raimundo 1992, Loguercio & Aleixo 2001).

Barros et al. (2004) enumeram alguns fatores que podem influenciar na classe e no número de microrganismos da microbiota do queijo Minas Frescal, sendo: a contaminação inicial da matéria-prima que chega à fábrica e sua temperatura de armazenamento; a contaminação produzida na fábrica a partir do contato com as mãos dos operários e com as superfícies de equipamentos; a contaminação do ar, da água e demais ingredientes que entram no processo industrial; a intensidade do tratamento térmico no que se refere a efeitos letais

sobre microrganismos de diferentes resistências; o processo de acondicionamento; e, o tempo de exposição a temperaturas que favorecem a proliferação de microrganismos.

Por apresentar elevado teor de umidade, ser produto de origem animal e passar por uma acentuada manipulação, o queijo Minas Frescal apresenta condições propícias para a contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana (Câmara et al. 2002). A presença de bactérias do grupo de coliformes totais e fecais em alimentos processados indica falha no processamento do produto, ou seja, a matéria-prima pode estar contaminada, utensílios e equipamentos utilizados na fabricação do produto podem estar mal higienizados e ainda a falta de higiene por parte dos manipuladores (Ritter et al. 2001). A presença de *E. coli* é indicativo de contaminação de origem fecal no alimento, evidenciando a ausência ou ineficiência de controle da matéria-prima, do processo de fabricação e/ou do produto acabado. Considerando que este microrganismo possui sorogrupos cuja patogenicidade é conhecida através da ação toxinogênica e infecciosa (Câmara et al. 2002), o seu isolamento no queijo, também sugere, a possibilidade da veiculação de outros microrganismos patogênicos ao homem (Pereira et al. 1999).

Os produtos derivados de leite têm representado importantes veículos de DTAs no mundo. Muitas espécies enteropatogênicas são encontradas em leite e queijos estocados em baixas temperaturas e consumidos sem aquecimento. A contaminação pós-pasteurização, o processo de fabricação e manipulação, equipamentos, temperatura inadequada durante o transporte e estocagem podem resultar em altos níveis de microrganismos patogênicos em queijos (Freitas et al. 1993, Adesiyum et al. 1998, Reibnitz et al. 1998).

De Buyser et al. (2001) avaliaram 60 surtos de DTAs causadas por leite e derivados, na França e outros países, no período de 1980 a 1997. Esses autores verificaram que a *E. coli* patogênica foi responsável por cerca de 20,0% dos episódios notificados e que o queijo fabricado a partir de leite cru ou não especificado, foi o alimento mais freqüentemente implicado. Em um estudo realizado por Coia et al. (2001) na Escócia, sobre a prevalência de *E. coli* em produtos de origem animal, entre eles 102 tipos de queijo fabricados a partir de leite cru, encontraram 10 amostras com contagens acima dos padrões aceitáveis pelo sistema de saúde pública daquele país ( $1,0 \times 10^4$ UFC/g).

No Brasil, tem-se evidenciado a presença de microrganismos patogênicos em queijo Minas Frescal, sendo amplamente reconhecida a presença de coliformes fecais neste produto em várias investigações. Pereira et al. (1999) encontraram contagens de coliformes fecais acima dos limites permitidos pela legislação, em 90,0% de 168 amostras de queijo Minas Frescal, na cidade de Belo Horizonte/MG. Em estudo realizado por Loguercio e Aleixo (2001) em Cuiabá/MT, foi detectada contaminação inaceitável por coliformes fecais em 93,3% de 30 amostras de queijo Minas Frescal analisadas. Em Poços de Caldas/MG, Almeida Filho e Nader Filho (2002), estudaram a ocorrência de coliformes fecais e *E. coli* em 80 amostras de queijo Minas Frescal e os resultados evidenciaram presença de coliformes fecais em 37,5% e *E. coli* em 30,0% das amostras.

No estado de Mato Grosso do Sul, Câmara et al. (2002) isolaram *E. coli* em 70,0% das 20 amostras de queijo Minas Frescal. Kottowitz e Guimarães (2003), realizaram avaliação microbiológica de queijos coloniais produzidos no estado do Paraná sendo encontradas contagens superiores às aceitáveis pela legislação, em 33,3% das 12 amostras analisadas.

No município do Rio de Janeiro/RJ em um primeiro estudo conduzido por Araújo et al. (2002), das 45 amostras de queijo Minas Frescal avaliadas a *E. coli* foi isolada em 97,7% sendo confirmada a presença de cepas patogênicas (EPEC) em 19,1% destas; em um segundo trabalho, Barros et al. (2004), avaliaram 30 amostras de diferentes marcas deste produto durante oito meses, e encontraram contagens de coliformes fecais em 63,0% destas.

Em estudo retrospectivo sobre qualidade de queijos comercializados no Distrito Federal, desenvolvido entre 1997 e 2001, por Cardoso e Araújo (2004), foram analisados 196 laudos de amostras coletadas pelo Programa de Vigilância Sanitária. Destas 42,0% foram reprovadas e a presença de coliformes fecais acima dos padrões legais foi detectada em 26,5% das amostras. Roos et al. (2005), encontraram contagens inaceitáveis de coliformes fecais em 20,0% das 25 amostras de queijo colonial, na cidade de Três Passos/RS.

A legislação e as políticas nacionais prevêm ser fundamental a vigilância sanitária em toda a cadeia produtiva, para definir, orientar e intervir em pontos e fases críticas que acarretem riscos ao consumidor, especialmente em pequenas e médias empresas, não detentoras de eficiente controle de qualidade (Cardoso & Araújo, 2004). Deste modo o queijo Minas Frescal assume considerável importância em saúde pública, dadas as condições peculiares de produção, exigindo maior atenção por parte dos órgãos oficiais, principalmente no que concerne ao controle e fiscalização higiênico-sanitária do produto (Pereira et al. 1999, Araújo et al. 2002, Schouten et al. 2004, Roos et al. 2005).

## 2.6 MANIPULADOR

A qualidade de produtos nunca ocorre por acaso. É sempre o resultado de esforços aplicados no controle das diferentes etapas do procedimento e processamento de alimentos. Os fatores tecnológico e humano afetam essa qualidade, no entanto, o indivíduo é o fator mais importante a ser considerado quando ocorre surtos de DTAs envolvendo alimentos manipulados (Lima et al. 1998).

A OMS (1989), em seu documento *Métodos de vigilancia sanitaria y gestión para manipuladores de alimentos*, define que o termo “manipulador de alimentos”, num sentido amplo, corresponde a qualquer indivíduo que entre em contato com um produto alimentício ou parte dele, nas etapas de produção, processamento, embalagem, armazenamento, transporte, distribuição e venda de alimentos.

Segundo Silva Jr. (2005), a OMS relata que mais de 60,0% das DTAs são provocadas por agentes microbianos, ressaltando que o manipulador é o principal veículo desta transmissão, durante o preparo de alimentos. Tais indivíduos podem ser possíveis veiculadores sintomáticos e assintomáticos de patógenos, quando procedem à aplicação de técnicas incorretas na produção de alimentos, na higienização de equipamentos, utensílios e do próprio ambiente (Rêgo et al. 1999).

Nas etapas de preparo, os princípios de higiene pessoal têm o objetivo de garantir que aqueles que entram em contato, direta ou indiretamente, com os alimentos não venham a contaminá-los (Sgarbieri 1993). Considerando que os manipuladores de alimentos, em geral, possuem educação formal deficiente, Góes (2001), sugere que os mesmos recebam formação em higiene pessoal e de

alimentos, por meio de metodologia que considere suas limitações, ressaltando a importância da educação em serviço de forma contínua e planejada. Além da importância da capacitação da mão de obra, considera-se relevante adequar os conhecimentos do manipulador ao avanço da tecnologia por meio de reciclagem do pessoal em todas as etapas de produção e, a necessidade de ações de monitoramento para efeito de controle de qualidade dos alimentos, desde a seleção da matéria-prima à obtenção do produto final.

As empresas produtoras de alimentos vêm se preocupando em investir no aperfeiçoamento de técnicas que promovam o fornecimento de alimentos com qualidade higiênico-sanitária, entre elas a capacitação de manipuladores de alimentos. Considerando o grande desafio que essa atividade educativa representa, Bellizzi et al. (2005) realizaram um levantamento, entre 1994 e 2003, com o objetivo de identificar o conteúdo e as estratégias pedagógicas normalmente empregadas, bem como, as dificuldades enfrentadas na implantação de cursos, sendo estas, principalmente, o nível de escolaridade dos manipuladores de alimentos, sua indisponibilidade de horário para a realização do treinamento e a ausência do envolvimento da gerência.

Para minimizar os efeitos dos vícios de funcionários que lidam com alimentos, Germano (2003), propõe conhecer bem a cultura dos manipuladores; observá-los em seu cotidiano, para que os pontos fracos em relação à manipulação sejam identificados, bem como a dinâmica das relações interpessoais no serviço; conhecer as condições de trabalho e os maiores perigos em termos de segurança alimentar para os consumidores. As ações a serem realizadas deveriam envolver também o setor administrativo da empresa. Isto tornaria viável a implantação do programa de capacitação, no qual

disponibilidades de horário e de local para a sua realização deveriam ser respeitados.

A literatura têm demonstrado que o perfil higiênico-sanitário dos manipuladores de alimentos tem se mostrado, freqüentemente inaceitável, no que diz respeito à contaminação microbiana encontrada em diversos sítios anatômicos (Oliveira et al. 2003). Manipuladores contaminam alimentos via contato manual ou via trato respiratório através de tosse, de espirro e a contaminação geralmente ocorre após tratamento térmico do alimento (Jablonski & Bohach 1997, Rosec et al. 1997). A presença de coliformes fecais indica que houve contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene aquém dos padrões mínimos de segurança, pois um número elevado destes microrganismos evidencia falha na higienização das mãos de manipuladores, indicando grave contaminação de origem fecal (Brod et al. 2002, Maciel et al. 2002).

Estudo realizado em restaurantes de quatro empresas da área metropolitana de Caracas na Venezuela, detectou 21,9% de incidência de *E. coli* nas mãos de manipuladores, 57,9% em equipamentos e utensílios e, 56,3% nas superfícies e ambiente. Foi constatado que a qualidade microbiológica dos alimentos era inaceitável e que existiam dificuldades de realizar treinamentos contínuos do pessoal envolvido na preparação dos alimentos dado o descaso por parte destes (Curtis et al. 2000).

No Brasil, estudos demonstram alta prevalência de portadores de coliformes fecais e *E. coli* entre manipuladores de alimentos. Salles e Goulart (1997) encontraram elevados índices de *E. coli* em mãos de manipuladores de lactários hospitalares do município de Florianópolis/SC, evidenciando uma possível contaminação recente de origem fecal, visto que as amostras foram coletadas no decorrer da jornada de trabalho. Cardoso (1999) realizou uma

investigação em restaurantes industriais do pólo petroquímico de Camaçari/BA, demonstrando contaminação por coliformes fecais em 97,0% das pessoas que preparavam alimentos, indicando que a manipulação era efetuada em condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Pinto et al. (2001), em avaliação microbiológica das mãos de manipuladores em uma fábrica de pão de queijo em Belo Horizonte/MG, apontaram presença de coliformes fecais em 35,5% destes. Monteiro et al. (2001) realizaram análise bacteriológica das mãos de manipuladores de uma cozinha industrial no Ceará, onde o isolamento de *E. coli* ocorreu em 55,0% dos indivíduos.

Na cidade de Limoeiro do Norte/CE, Mendes et al. (2002), avaliaram as condições higiênico-sanitárias da palma das mãos de merendeiras em escolas estaduais encontrando coliformes fecais em 50,0% dos estabelecimentos, todos em níveis além dos limites aceitáveis. Souza et al. (2004), analisaram a microbiota das mãos de manipuladores de estabelecimentos que comercializam alimentos no município de João Pessoa/PB e obtiveram resultados alarmantes, ou seja, em todas as amostras a *E. coli* estava presente. Segundo estes autores, tais dados comprovam o postulado que a maioria das pessoas envolvidas com a produção de alimentos carece de conhecimentos relativos aos cuidados higiênicos e condições operacionais que devem ser seguidos na elaboração dos alimentos, podendo desta forma agir como elementos comprometedores da qualidade final do produto.

Quando um produto, como o queijo Minas Frescal, é fabricado de forma artesanal por manipuladores não treinados, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser

observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou recontaminação do produto (Loguercio & Aleixo, 2001).

É amplamente reconhecida a presença de bactérias de origem fecal nos queijos produzidos a partir de leite cru, sendo atribuído falhas no processamento de pasteurização ou mesmo uma recontaminação do leite após o tratamento térmico correto. A introdução da mão do manipulador para verificar o ponto de corte no tanque de repouso também é um fator preponderante para a elevada contaminação do queijo Minas Frescal. A presença de coliformes fecais acima do limite legal pode significar, também, a veiculação de outros microrganismos patogênicos ao homem. A implantação de manual de boas práticas de fabricação (MBPF) nas fábricas e uma efetiva fiscalização no transporte e na comercialização deste, diminuiria o risco potencial que ele oferece à população consumidora (Loguercio & Aleixo 2001, Almeida Filho & Nader Filho 2002, Barros et al. 2004).

## 2.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia busca identificar fatores que levam a distribuição de doenças em determinado período de tempo e espaço geográfico assim como os fatores que estabelecem a transmissão, manifestação e progressão de enfermidades. Além disso, a epidemiologia é sempre motivada pela oportunidade e possibilidade de ações de intervenção e de prevenção (Rouquayrol & Filho 2003).

Técnicas moleculares podem ser aplicadas na mensuração dos fatores ligados ao hospedeiro e ao agente. Quando aplicadas em estudos de doenças os resultados avançados aumentam a habilidade de detectar associações de forma mais confiável. Tais estratégias ajudam a estratificar e refinar dados

proporcionando mensurações mais sensíveis e específicas, as quais facilitam atividades epidemiológicas incluindo vigilância, investigações de surtos, identificação de modelos de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente desconexos, caracterizando interações hospedeiro–patógeno, detectando organismos não cultiváveis e promovendo melhor entendimento da patogênese das doenças, em nível molecular (Foxman & Riley 2001).

Estudos epidemiológicos buscam estabelecer a fonte de microrganismos para alimentos utilizando técnicas de tipificação bacteriana podendo caracterizar microrganismos isolados de possíveis fontes (animais, manipulador, equipamentos e outros fômites) e compará-los fenotipo e genotipicamente com os isolados dos alimentos. Estes estudos há mais de duas décadas têm sido considerados uma sub-especialidade da Epidemiologia compondo a chamada “Epidemiologia Molecular”. Considerando a definição desses dois termos, esta última compreenderia o emprego de técnicas de biologia molecular ao estudo de distribuição e ocorrência de marcadores de doenças em uma população (Foxman & Riley 2001), e suas aplicações práticas incluiriam a identificação de microrganismos responsáveis por doenças infecciosas e determinação de sua fonte, as relações biológicas, os mecanismos de transmissão e os genes responsáveis por virulência, antigenicidade e resistência a drogas (Levin et al. 1999).

Os surtos de doenças infecciosas, entre elas as DTAs, frequentemente resultam de uma exposição a uma fonte comum do agente etiológico. Geralmente, este agente é derivado de uma única célula onde sua progênie é geneticamente idêntica ou fortemente relacionada ao microrganismo fonte. Em termos epidemiológicos os microrganismos envolvidos no surto são clonalmente relacionados, ou seja, tem origem comum. Tais organismos compartilham fatores

de virulência, traços bioquímicos, características genômicas. Entretanto existe heterogeneidade suficiente em nível de espécies que organismos isolados de diversas fontes em diferente período de tempo e em diferentes regiões geográficas podem ser classificados em subtipos ou cepas. O processo de subtipificação é importante epidemiologicamente para reconhecer surtos, detectar a transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, determinar fonte de infecção, reconhecer particularmente cepas virulentas e monitorar programas de intervenção (Olive & Bean 1999).

Há algum tempo têm-se evidenciado que existem significantes variações na incidência e gravidade de doenças causadas por microrganismos classificados como membros da mesma espécie. Como resultado da compreensão das bases microbiológicas destas variações e classificando as espécies mais rigorosamente, foi desenvolvida uma variedade de esquemas de tipificação através de marcadores sorológicos e fenotípicos. Esses estudos revelam que as linhagens bacterianas conservam sua integridade genética por longos intervalos de tempo e distâncias, ou seja, seus genomas não são facilmente desorganizados ou reorganizados por mutações e recombinações recorrentes. Esta visão de estrutura genética de populações bacterianas é conhecida como “conceito de clone” (Levin et al. 1999).

Gerações de microbiologistas têm observado que isolados da mesma espécie não relacionados epidemiologicamente, sempre diferem em múltiplas características. Sistemas de tipificação baseiam-se na premissa que isolados clonalmente relacionados podem apresentar características pelas quais podem ser diferenciados de isolados não relacionados (Arbeit 1999).

A caracterização de microrganismos por tipificação molecular proporcionando evidências de relações genéticas tem sido frequentemente

utilizada por microbiologistas e epidemiologistas em estudos de doenças infecciosas. A necessidade em estabelecer essas relações pode surgir durante uma investigação de surtos nos quais organismos identificados como da mesma espécie e similar perfil de resistência a antimicrobianos, determinam a disseminação clonal da doença dentro de um micro ambiente bem como a fonte de infecção. Assim a vigilância epidemiológica requer monitoramento da distribuição clonal e determinação da prevalência de cepas dentro de uma população com o objetivo de controlar a emergência e disseminação de patógenos específicos (Tosin et al. 2003).

## 2.8 TIPIFICAÇÃO MICROBIANA

Sistemas de tipificação são usados na discriminação de isolados não relacionados epidemiologicamente pertencentes à mesma espécie microbiana baseando-se em características fenotípicas e genotípicas chamadas de marcadores epidemiológicos. Também são utilizados para reconhecer fortes relações de isolados derivados de um mesmo surto ou cadeia de transmissão, refletindo o fato de que eles são descendentes de uma única célula (Strulens 1996).

Existem divergências evolucionárias que refletem a ocorrência de mutações ao acaso, não letais, incluindo substituições de pares de bases, deleção de genes individuais e aquisição de DNA de outras espécies. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares altamente sensíveis, alterações sutis no genoma podem ser precisamente detectadas (Arbeit 1999).

Sistemas de tipificação são usados para definir características do objeto de estudo. Os procedimentos são específicos para diferentes parâmetros fenotípicos

ou genéticos, podendo ser gerais, ou seja, aplicáveis a qualquer espécie microbiana, ou espécie e/ou gênero específicos. Para se caracterizar uma técnica de tipificação padrão deve ser considerada sua ótima tipabilidade, alto grau de reprodutibilidade, estabilidade adequada e um poder de resolução sem precedentes. É também recomendável que os procedimentos sejam acessíveis, ou seja, de fácil execução e de custos não elevados (van Belkum et al. 2001).

Segundo Arbeit (1999), não existe nenhuma técnica padrão ouro pela qual se julgue um método de tipificação ou que consistentemente forneça resultados verdadeiramente positivos ou negativos. Conseqüentemente, os resultados de sistemas de tipificação devem ser considerados em relação aos dados epidemiológicos juntamente com outros parâmetros.

Os sistemas de tipificação podem ser caracterizados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório, facilidade de execução e interpretação. A tipabilidade se refere à habilidade em obter resultados não ambíguos para os isolados analisados; a reprodutibilidade se refere à habilidade da técnica em obter resultados idênticos quando a mesma cepa é testada repetidamente; e o poder discriminatório se refere à habilidade em diferenciar cepas não relacionadas epidemiologicamente (Tenover et al. 1997, Olive & Bean 1999).

As técnicas mais freqüentemente aplicadas são aquelas baseadas em ácidos nucleicos, sendo assim mais recomendadas do que procedimentos orientados por características fenotípicas em estudos de taxonomia, epidemiologia e evolucionários. Diversos métodos para determinação de variações genéticas entre isolados microbianos têm sido descritos, cada um com limitações dependentes de alvos no ácido nucleico, que devem ser consideradas quando são realizados estudos de tipificação molecular e subseqüentemente

cálculo das relações entre cepas. O método a ser utilizado deve ser determinado pela natureza das questões a serem respondidas (van Belkum et al. 2001).

A habilidade em utilizar métodos de tipificação molecular para acompanhar a disseminação geográfica de clones específicos vem proporcionar novas informações e oferecer oportunidades para elucidar aspectos epidemiológicos e de patogenicidade microbiana (Tosin et al. 2003).

Resumidamente, os métodos de tipificação epidemiológica são aplicados em estudos de genética de populações bacterianas, patogênese e história natural de infecções, vigilância epidemiológica de doenças infecciosas e investigação de surtos, fornecendo assim, informações importantes quanto a extensão de disseminação epidêmica de clones microbianos na população exposta, número de clones envolvidos na transmissão e infecção, identificação de fonte de contaminação e veículos de transmissão, identificação e monitoramento de reservatórios de clones epidêmicos na população e/ou ambiente e na avaliação da eficácia de medidas de controle adotadas na contenção ou interrupção de disseminação de clones epidêmicos (Strulens 1996).

### **2.8.1 Técnicas de tipificação microbiana**

Os métodos de tipificação podem ser agrupados em técnicas fenotípicas, que detectam características expressas pelos microrganismos, e técnicas genotípicas, que envolvem análise baseada diretamente no DNA cromossômico ou de elementos genéticos extracromossômicos (Arbeit 1999).

Técnicas fenotípicas são aquelas que caracterizam os produtos de expressão de genes para diferenciar cepas. São limitadas pela capacidade dos microrganismos em alterar a expressão de genes, pois essas propriedades

tendem a variar em função das trocas nas condições na fase de crescimento além de mutações espontâneas que podem resultar em regulação anormal ou alteração funcional do gene responsável por um fenótipo determinado (Arbeit 1999, Tenover et al. 1997).

Entre as técnicas fenotípicas mais comuns estão: biotipificação que se refere ao padrão de atividades metabólicas expressas por um isolado incluindo reações bioquímicas, morfologia de colônias e tolerância ambiental; sorotipificação que se baseia nas diferenças de determinantes antigênicos expressos na superfície celular dentro da mesma espécie; fagotipificação que determina a susceptibilidade ou resistência das cepas isoladas à lise por bacteriófagos (vírus que parasitam bactérias) padrões; eletroforese enzimática (MLEE - *multilocus enzyme electrophoresis*) onde os isolados são analisados pela diferente mobilidade eletroforética de determinadas enzimas metabólicas que apresentam; e teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Arbeit 1999).

Falhas associadas às análises fenotípicas levaram ao desenvolvimento de métodos de tipificação baseados no genótipo microbiano ou seqüência de DNA. Tais técnicas minimizam problemas com tipabilidade e reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de base de dados para caracterização de organismos, tendo-se revelado como preferenciais para tipificação de cepas dos patógenos bacterianos mais comuns, tanto em laboratórios clínicos quanto de referência (Maslow et al. 1993).

Com a disseminação de ferramentas para análise de DNA, quase todas as técnicas envolvendo esta análise têm sido aplicadas à tipificação de cepas, porém, nenhuma delas combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade, além da complexidade na interpretação de resultados e aplicação efetiva a estudos epidemiológicos (Arbeit 1999).

Nos últimos anos técnicas moleculares têm emergido como métodos de escolha na tipificação genotípica de isolados microbianos sendo: análise plasmidial – sofre as limitações inerentes ao fato dos plasmídios serem móveis e extracromossomais, portanto, não fazem parte do genótipo cromossomal que define as cepas, podendo ser perdidos ou adquiridos por uma cepa e conseqüentemente, isolados epidemiologicamente relacionados podem apresentar perfis plasmidiais diferentes; análise por enzimas de restrição (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP) de DNA cromossomal que se baseia no tratamento do DNA por endonucleases que possuem vários sítios de restrição gerando inúmeros fragmentos que podem ser separados e observados por eletroforese em gel de agarose; southern blot que detecta somente o fragmento de restrição associado a um *locus* cromossomal específico se baseando na digestão do DNA bacteriano, separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose e transferência (*blotting*) dos fragmentos para uma membrana de nitrocelulose ou nylon onde os fragmentos contendo seqüências específicas são detectados usando-se sonda marcada; ribotipificação que se refere a uma análise *southern blot* onde as cepas são caracterizadas por RFLP seguido de hibridização com sondas do operon ribossomal; sistema de tipificação aplicando PCR (AP-PCR - *arbitrarily primed PCR*) que é a reação em cadeia da polimerase utilizando pequenos primers arbitrários; e RFLP e eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) que consiste na digestão do DNA por enzimas de restrição (RFLP) resultando em 5 a 20 fragmentos relativamente grandes que são observados depois da corrida em gel de agarose em campo elétrico cuja orientação é mudada periodicamente (pulsada) (Maslow et al 1993, Tenover et al. 1997, Arbeit 1999).

### 2.8.1.1 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos – Antibiograma

Testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, incluindo drogas e outras substâncias químicas podem ser realizados através dos métodos de difusão em disco ou de diluição. Os parâmetros de resistência, biologicamente definidos para a detecção de determinantes de resistência adquirida podem não coincidir com aqueles empregados nos laboratórios de microbiologia clínica. Entretanto, concentração inibitória mínima ou análises quantitativas de tamanho de zona de inibição de crescimento são mais informativas do que modelos de resistência qualitativa. A tipificação por antibiograma pode, com uma relevante seleção de marcadores, ser aplicada à maioria das espécies microbianas. A discriminação é dependente da diversidade e da prevalência relativa de mecanismos de resistência adquirida detectável no estudo dos isolados. A estabilidade do modelo de resistência pode ser insuficiente para o seu uso como um marcador clonal, especialmente se determinantes de resistência são originados de plasmídios ou expressos sob controle de sistemas regulatórios complexos. O antibiograma é um dos mais valiosos métodos de triagem em laboratório clínico pela facilidade de uso e interpretação além de ser tecnicamente simples, de baixo custo e apropriado para um grande número de isolados (Strulens 1996).

Laboratórios de microbiologia clínica rotineiramente determinam a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados. Tanto métodos manuais quanto automatizados são largamente disponíveis, rigorosamente controlados quanto à qualidade, de fácil utilização e de baixo custo. Esses dados são disponíveis a clínicos e médicos infectologistas. A identificação de um novo ou não usual modelo de resistência a antibiótico entre isolados cultivados de

múltiplos pacientes é frequentemente a primeira indicação de um surto (Arbeit 1999).

Em estudos epidemiológicos detalhados, tais testes apresentam limitação de uso, pois, apresentam baixo poder discriminatório uma vez que a resistência antimicrobiana está sob pressão seletiva em hospitais e outros centros de tratamento além de estar frequentemente associada com elementos genéticos móveis. Alterações no antibiograma podem refletir variação fenotípica, assim, isolados que são epidemiologicamente relacionados e geneticamente indistinguíveis podem manifestar diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos pela aquisição de novo material genético, com o tempo ou com perda de plasmídeo (Tenover et al. 1997).

Existem diferentes mecanismos genéticos pelos quais um isolado pode tornar-se abruptamente resistente a um antibiótico particular. Isto inclui mutações pontuais espontâneas e aquisição de genes de resistência específica via plasmídios e transposons de outras cepas ou mesmo de outras espécies. Mesmo um simples plasmídeo ou um transposon composto podem carregar vários elementos de resistência, e assim, a resistência a múltiplos agentes antimicrobianos pode ser adquirida simultaneamente. Por outro lado, na ausência de pressão seletiva, tais elementos podem ser perdidos. Como consequência destes vários mecanismos genéticos, diferentes cepas podem desenvolver modelos de resistência similares e, por outro lado, modelos de susceptibilidade de isolados clínicos seqüenciais representando a mesma cepa podem diferir para um ou mais antibióticos (Maslow et al. 1993, Arbeit 1999).

Os testes de resistência a antimicrobianos podem ser muito úteis como triagem inicial para estudos de correlação de cepas de microrganismos em surtos

de DTAs, podendo ser complementados com métodos de tipificação genotípica (Tenover et al. 1997, Arbeit 1999).

Nas últimas décadas, muitos métodos têm sido aplicados para comparar cepas de *E. coli* na tentativa de identificar os mecanismos de transmissão e fontes de contaminação (Zadoks et al. 2002). Entre as técnicas fenotípicas utilizadas, o teste de suscetibilidade a antimicrobianos tem sido especialmente usado devido a seu baixo custo, facilidade de execução, além de contribuir para informar sobre a resistência dos microrganismos a essas substâncias (Kluytmans et al. 1995, Acco et al. 2003).

A alta incidência de resistência a drogas pode ser atribuída à ampla utilização de antibióticos no tratamento da população humana e animal. O uso indiscriminado de substâncias antibióticas associadas à não observância do período de carência destas drogas leva a uma seleção de cepas. Esta resistência pode comprometer o efeito da antibioticoterapia utilizada em infecções humanas ou em animais causadas por microrganismos (Valquez-Moreno 1990). Como consequência a emergência de bactérias multi-resistentes a antibióticos tem se constituído no maior desafio no tratamento de doenças infecciosas, fato este que demanda a identificação e controle das fontes de contaminação e dos mecanismos de transmissão (Goñi et al. 2004).

A ocorrência de cepas resistentes aos antibióticos, consideradas selvagens, é fato preocupante, quando são observadas as características de patogenicidade da bactéria em questão e a possibilidade de infecções extra-intestinais, decorrentes de gastroenterites em grupos mais sensíveis da população, como as crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Varnanm & Evans 1991). Segundo Lazaro (1994), coliformes antibiótico-resistentes podem ser importantes não só por sua patogenicidade como também por transferirem

resistência a outras bactérias patogênicas, podendo se converter em um problema de saúde pública.

Vários estudos têm mostrado um crescente isolamento de bactérias resistentes a antimicrobianos, fenômeno que vem despertando grande interesse entre os pesquisadores, particularmente com relação a *E. coli*. Tais relatos citam o aparecimento de cepas resistentes a diversas drogas, tais como gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, amicacina e sulfametrimina sulfadiazina trimetoprim, inclusive com a ocorrência de cepas multi-resistentes a dois ou mais desses antibióticos de importância terapêutica (Lazaro 1994).

Radu et al (2001) analisaram carne bovina e de frango comercializadas em duas cidades da Malásia, isolando 31 cepas de *E. coli* O157. Ao testarem a susceptibilidade para 14 antimicrobianos, verificaram que todas as cepas isoladas foram resistentes a dois ou mais antibióticos testados.

Nos EUA, Zhao et al. (2001) coletaram amostras em humanos, gado e carne bovina e encontraram um total de 50 isolados de STEC onde 78,0% destas apresentaram resistência a duas ou mais classes de antibióticos, com múltipla resistência a estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina. Em outro estudo, Schroeder et al. (2003), isolaram 472 cepas de *E. coli* em carnes (bovina, suína, de frango e peru) comercializadas em Washington no período de 1998 a 2000. Tais isolados apresentaram resistência à tetraciclina (59,0%), sulfametoxazol (45,0%), estreptomicina (44,0%), cefalotina (38,0%), ampicilina (35,0%) e a outras drogas em menor extensão. Tais resultados indicam que cortes de carne comercializados podem estar contaminadas com *E. coli* multi-resistente.

Khan et al. (2002) relataram a resistência a um ou mais antibióticos em 49,2% de cepas de STEC isoladas de diversas fontes na Índia, com algumas delas exibindo multi-droga-resistência (MDR). Bactérias resistentes a

antimicrobianos isoladas em animais podem colonizar populações humanas e possivelmente transferir essa resistência através das fontes alimentares contaminadas.

Na Alemanha, Klein e Bulte (2003), no período de 1987 a 1998, isolaram 60 *E. coli* em diversas fontes (fezes de animais e humanos e produtos a base de carne). Os resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos revelaram resistência maior a cefalotina (78,0%) e tetraciclina (27,0%). O aumento potencial de resistência na população de isolados suscetíveis deve ser considerado nas ações de vigilância para reduzir a resistência a antibióticos na cadeia alimentar.

Srinivasan et al. (2004), isolaram 131 diferentes cepas de *E. coli* de glândula mamária de gado com mastite clínica em diferentes fazendas de Nova York, entre 1999 a 2003. Todas as cepas foram resistentes à cefalosporina, mais de 95,0% a ampicilina, rifamicina e penicilina, e mais de 70,0% foram resistentes a eritromicina, rifampicina e vancomicina. Tais relatos sugerem que as *E. coli* causadoras de mastite podem constituir reservatório de genes de resistência a antimicrobianos com importante papel na disseminação destes genes a outros patógenos e bactérias comensais no ambiente de produção leiteira.

Babák et al. (2005), coletaram 1.425 amostras de leite não pasteurizado e 213 amostras de produtos lácteos, entre eles queijo Frescal, na República Tcheca durante 2000 e 2002, encontrando 915 isolados de *E. coli* que foram testadas quanto à susceptibilidade a vários antimicrobianos. Pela análise de frequência dos elevados valores de concentração inibitória mínima (CIM), verificaram resistência dos isolados em relação à ampicilina, eritromicina, neomicina, estreptomicina, cotrimoxazol e tetraciclina.

Em pesquisa realizada na Coreia no período de 2000 a 2003, dos 45 isolados de *E. coli* O157 em amostras de gado, 32 foram resistentes a pelo

menos um antibiótico e 28 isolados foram resistentes a quatro ou mais drogas testadas, sendo a resistência maior a estreptomicina, tetraciclina e sulfizaxol, sugerindo que a maioria dos isolados de *E. coli* resistentes podem causar doenças em humanos (You et al. 2006).

Em São Luis/MA, Costa et al. (2002) avaliaram o comportamento de 16 *E. coli* isoladas de produtos lácteos frente à ação de antimicrobianos, encontrando 100,0% de resistência a ampicilina e carbenicilina, 75,0% a amicacina e 50,0% ao clorafenicol. Okura & Ávila (2004) em pesquisa sobre o isolamento de enteropatógenos em leite cru produzido nas microrregiões do Triângulo Mineiro/MG, isolaram 70 cepas de *E. coli* onde 30,0% apresentou resistência a ampicilina e 8,6% a cefalotina.

Lira et al. (2004), realizaram uma investigação em sete estados brasileiros onde coletaram 2.144 amostras de leite ordenhado de gado com mastite, isolando 182 cepas de *E. coli*, sendo 22 (12,0%) de STEC. Tais cepas STEC foram testadas contra 10 agentes antimicrobianos e a resistência a pelo menos uma droga testada foi encontrada em 100% dos isolados. A maior incidência de resistência observada foi a cefalotina (86,3%), seguida da tetraciclina e doxiciclina (63,6%).

A tipificação pelo antibiograma apresenta como principal desvantagem a variabilidade da expressão da resistência que também é susceptível à instabilidade devido à transmissão horizontal e perda dos elementos genéticos extracromossômicos (Montesinos et al. 2002). O antibiograma ainda é válido como primeira aproximação da origem clonal ao comparar dois isolados bacterianos, especialmente em laboratórios de rotina (Hoefnagels-Schuermans et al. 1997). Para uma boa aproximação sempre se deve considerar a epidemiologia do microrganismo, a genética bacteriana, os perfis de susceptibilidade habituais e os

mecanismos moleculares de resistência. Finalmente é importante saber identificar no perfil de susceptibilidade, um bom marcador que permita aproximar-se à clonalidade entre isolamentos bacterianos (Labarca 2002).

#### 2.8.1.2 Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE)

Desenvolvido por Schwartz e Cantor (1984), como uma ferramenta para examinar o DNA cromossomal de organismos eucarióticos, PFGE é uma variação da eletroforese em gel de agarose na qual a orientação do campo elétrico que atravessa o gel é modificada periodicamente (pulsada). A caracterização de grandes fragmentos de DNA é limitada por dois fatores, primeiro, os fragmentos de DNA igual ou maior a 25Kb não são ou são pobremente separados pela eletroforese em gel de agarose convencional, e segundo, o DNA preparado em solução é quebrado espontaneamente em fragmentos igual ou menor que 100Kb. Por razões técnicas, essa modificação crítica permite que os grandes fragmentos de DNA sejam separados eficientemente pelo tamanho. Neste método, o DNA inteiro é obtido a partir da incorporação de células microbianas intactas em blocos de agarose onde ocorre a lise enzimática da parede celular e a digestão de proteínas celulares. O genoma bacteriano, que tipicamente possui o tamanho de 2.000 a 5.000 Kb é digerido por uma endonuclease específica que apresenta poucos sítios de restrição e assim gera aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição de aproximadamente de 10 a 800 Kb (Tenover et al. 1997).

Nesta técnica o gel de agarose é posicionado numa câmara, entre três grupos de eletrodos formando um hexágono em volta do gel. Ao invés de aplicar uma corrente elétrica no gel em uma única direção, como é feito em eletroforese convencional, a corrente é aplicada primeiramente na direção de um grupo de

eletrodos, depois é transferida ao segundo grupo de eletrodos por um curto período de tempo (um pulso) e, em seguida, para o terceiro grupo de eletrodos. Assim o campo elétrico que leva o DNA a migrar no gel é proporcionado em pulsos que alterna nos três grupos de eletrodos. Isto leva o DNA a agitar através do gel e o movimento de cá para lá resulta em um alto nível de resolução do fragmento. A eletroforese destes fragmentos permite a visualização do perfil de restrição, que compreende uma série de bandas, com tamanhos diferentes, separadas efetivamente no campo pulsado. A relação entre os isolados bacterianos é inferida pela similaridade dos perfis de restrição originados (Arbeit 1999, Singer et al. 2004).

A maior dificuldade associada ao PGFE seria a demanda técnica do procedimento e o custo inicial do equipamento eletroforético assim como os softwares especializados para análise. Entretanto, a interpretação dos resultados de PFGE é relativamente simples e guias consensuais para correlação de variações nos perfis de restrição com relações epidemiológicas já foram publicados (Tenover et al. 1997, Senna et al. 2002).

Este método requer interpretação subjetiva e comparação dos perfis de restrição e imagens (Singer et al. 2004). A utilização de programas computadorizados para comparação de perfis tem aprimorado a interpretação dos resultados obtidos por PFGE (Shopsin & Kreiswirth 2001).

O principal objetivo da tipificação molecular de cepas é definir relações genotípicas entre grupos de isolados e assim inferir relações epidemiológicas. Todos isolados bacterianos são teoricamente tipificáveis pelo PFGE, com resultados altamente reprodutíveis. A simplicidade relativa dos perfis de restrição facilita grandemente a análise e comparação de múltiplos isolados. Esta técnica é altamente discriminatória e reprodutível com desempenho comparável ou superior

a outras técnicas disponíveis e tem sido aplicada com sucesso à tipificação de um grande número de microrganismos Gram-negativos, Gram-positivos e espécies de micobactérias (Matushek et al. 1996, Blanc et al. 2001, Bidet et al. 2005). PFGE é o mais efetivo para diferenciação de isolados de *E. coli* sendo considerado mais eficiente que outras técnicas (Arbeit 1999).

O coeficiente de mutação, incluindo mutações pontuais, rearranjos genéticos e transferência horizontal de elementos móveis como fagos e transposons, é diferente entre as diversas espécies bacterianas. Em um sistema de tipificação, essas mutações influenciam diretamente a estabilidade dos padrões tipificáveis durante os ciclos de replicação de um dado clone bacteriano. Assim para um determinado microrganismo, a interpretação epidemiológica de padrões de PFGE vai depender das escalas de tempo e espaço considerados (Blanc et al. 2001, Singer et al. 2004).

A análise através do PFGE é recomendada por ser considerado um método de referência para tipificação da maioria dos patógenos nosocomiais, sendo uma ferramenta muito útil para complementar as análises epidemiológicas de surtos. Particularmente para *E. coli*, esta parece ser uma ótima ferramenta, pois cada isolado não relacionado epidemiologicamente apresenta um único perfil (Maslow et al. 1993).

Em 1996, no Japão, análises de PFGE evidenciaram que um grande surto provocado por EHEC, com 9.000 casos registrados, consistiu na verdade, de múltiplos surtos tendo o maior *cluster* menos de 600 casos, mostrando diferentes padrões de PFGE daqueles encontrados em isolados não relacionados epidemiologicamente. Foi possível também ligar este grande *cluster* de casos ao consumo de broto de rabanete e não ao consumo de produtos de origem animal

como havia sido estabelecido anteriormente às essas análises (Watanbe et al. 1996, Kaper 1998).

Radu et al. (2001) empregaram o PFGE e RAPD-PCR (*randomly amplified polymorphic DNA* - PCR) para diferenciar cepas de *E. coli* O157 isoladas de amostras de carne bovina e frango, na Malásia, concluindo que a primeira técnica mostrou-se mais confiável na diferenciação de cepas patogênicas de *E. coli*. Tais autores citam que a diversidade genética observada entre as *E. coli* O157, com o uso de técnicas moleculares, pode subsidiar estratégias na investigação de potenciais problemas epidemiológicos causados por estes patógenos e a subtipificação de isolados pode contribuir com estudos de contaminação na indústria de alimentos.

No Reino Unido, Avery et al. (2004), compararam, com o uso do PFGE, isolados de *E. coli* associados a animais sem evidência clínica de infecções de rebanho bovino (amostras de pele, fezes e carcaça), carne bovina obtida em abatedores e casos de doenças em humanos. Os autores confirmaram a relevância da diversidade da *E. coli* O157 para o controle da contaminação de carne em abatedores.

PFGE em estudos epidemiológicos envolvendo contaminação de alimentos por cepas de *E. coli* patogênica, tem sido amplamente utilizado em vários países como na Alemanha (Lieseang et al. 2000, Weiner & Osek 2003), Áustria (Grif et al. 1998, Allerberger et al. 2001, 2003, Wagner et al. 2004), Brasil (Regua-Mangia et al. 2004), EUA (Barret et al. 1993, Hahm et al. 2003), França (Bidet et al. 2005, Espié et al. 2005), Índia (Khan et al. 2002), Itália (Picozzi et al. 2005), Japão (Watanabe et al. 1999), Malásia (Radu et al. 2001) e Reino Unido (Avery et al. 2002, 2004).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar *Escherichia coli* em amostras coletadas de um laticínio de Goiás, com vistas ao estabelecimento da relação de contaminação entre a matéria-prima, o manipulador e o produto final (queijo Minas Frescal).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizar o Isolamento e identificação de *E. coli* a partir de amostras de leite cru e de queijo Minas Frescal, assim como, de mãos e nasofaringe de manipuladores envolvidos na fabricação do queijo analisado;

3.2.2 Realizar o teste de susceptibilidade antimicrobiana como técnica fenotípica de tipificação bacteriana das cepas de *E. coli* isoladas das amostras coletadas;

3.2.3 Realizar a técnica de macrorrestrição de DNA com endonuclease *Xba I* (RFLP) seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) como teste genotípico de tipificação bacteriana das cepas de *E. coli* isoladas das amostras coletadas.

3.2.4 Estabelecer possíveis relações entre as cepas de *E. coli* isoladas de manipuladores e leite como fontes de contaminação para o queijo Minas Frescal (produto final).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBJETO DE ESTUDO

Foram coletados amostras de leite cru (matéria-prima), queijo Minas Frescal (produto final) e amostras provenientes de mãos e nasofaringe dos manipuladores envolvidos no processo de fabricação do queijo em questão.

### 4.2 LOCAL DA COLETA DE DADOS

A pesquisa foi desenvolvida durante o período de março de 2004 a fevereiro de 2005 em um laticínio de Goiás, sendo este um local de beneficiamento de leite, onde era recebido diariamente, à época do estudo, de 2.700 a 3.200 litros de leite cru, com produção de 2.000 a 2.500 litros de leite pasteurizado e 110 quilos de queijo Minas Frescal, que eram distribuídos para a comercialização na região da grande Goiânia, nos estabelecimentos para este fim.

O laticínio contava com quatro funcionários que realizavam tanto a recepção do leite cru, o processamento do leite pasteurizado e do queijo Minas Frescal como a embalagem dos produtos, higienização das instalações físicas, de equipamentos e utensílios.

### 4.3 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS (Midura & Bryant 2001, VandenBergh et al. 1999)

Durante a visita ao laticínio foram coletadas as seguintes amostras:

Leite cru – foram coletados 250 ml do leite cru diretamente do tanque de armazenamento de leite que era utilizado na preparação de queijo, em recipiente previamente esterilizado;

Queijo Minas Frescal – cada amostra constituiu-se de uma unidade de queijo fabricado a partir do leite cuja amostra foi coletada no dia, devidamente embalado;

Manipuladores – foram coletados, com suabes esterilizados, amostras da nasofaringe e mãos dos trabalhadores envolvidos no processo, que estavam trabalhando no dia da coleta. Os suabes foram colocados em tubos individuais contendo caldo cérebro coração (BHI).

Após a coleta, todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com placa de gelo reciclável, para evitar a sua alteração devido a temperatura ambiente, e transportadas imediatamente ao laboratório em um prazo de uma hora. O período de tempo entre a coleta e o processamento das análises microbiológicas não ultrapassou, em nenhum dos casos, seis horas.

#### 4.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental e no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

#### 4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

##### **4.5.1 Preparo das Amostras e Diluições (Midura & Bryant 2001, VandenBergh et al. 1999)**

Leite cru – Após a homogeneização foram preparadas as amostras pipetando alíquota de 1,0 mL do leite em tubo contendo 9,0 mL de água peptonada tamponada ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) 0,1%, esterilizada, pH 7,2. Em seguida, foram preparadas diluições decimais subseqüentes, transferindo-se 1,0 mL da diluição anterior para tubos contendo 9,0 mL de água peptonada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ );

Queijo Minas Frescal – Com auxílio de colher previamente esterilizada, foram pesadas em balança de precisão, 25g retiradas de várias partes do queijo obtido que, em seguida, foram colocadas em sacos esterilizados juntamente com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%, esterilizada, pH 7,2 e, homogeneizadas em *stomacher* por dois minutos, obtendo-se, assim, a diluição  $10^{-1}$ . Em seguida, foram preparadas as diluições decimais subseqüentes, de acordo com o leite cru;

Suabes da nasofaringe e mãos dos manipuladores – Após a coleta foram incubados, no próprio tubo com BHI utilizado no transporte, em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

#### **4.5.2 Isolamento e Identificação (FDA 2002)**

##### Análise Presuntiva para coliformes, coliformes fecais e *E. coli*:

Alíquotas de 1,0 mL das diluições preparadas a partir das amostras do leite cru e do queijo foram pipetadas para tubos contendo 10 mL de caldo lauril triptose (LST) e incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Completado o período de incubação verificou-se a formação de gás.

##### Análise Confirmativa para coliformes:

A partir dos tubos de LST considerados positivos, foram inoculados, com auxílio da alça bacteriológica de níquel-cromo, os tubos de ensaio contendo 10

mL de caldo verde brilhante bile 2,0% lactose (BGLB) com tubo de Durham invertido esterilizado. Logo após, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 48 horas. Completado o período de incubação verificou-se a formação de gás nos tubos de Durham, devido à fermentação da lactose.

Análise Confirmativa para coliformes fecais e *E. coli*:

A partir dos tubos de LST considerados positivos, foram inoculados, com auxílio da alça bacteriológica de níquel-cromo, os tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo *Escherichia coli* (caldo EC) com tubo de Durham invertido esterilizado. Logo após, os tubos foram incubados em banho-maria regulado a 45,5°C por 24 horas. Completado o período de incubação verificou-se a formação de gás nos tubos de Durham, devido à fermentação da lactose.

Análise Completa para *E. coli*:

A partir dos tubos de EC considerados positivos, foi agitado, gentilmente, cada tubo e com auxílio da alça bacteriológica de níquel-cromo, foram semeadas, por estrias, em placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB). Após a semeadura, as placas foram incubadas de forma invertida, em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Completado o período de incubação verificou-se a presença de colônias lactose positivas, ou seja, colônias negras metálicas ou com o centro negro, com transparência na periferia.

No caso das amostras obtidas da nasofaringe e mãos dos manipuladores, ou seja, a partir dos tubos de BHI incubados como descrito anteriormente, foram semeadas, por estrias, em placas de Petri contendo EMB. Após a semeadura as placas foram incubadas de forma invertida, em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Completado o período de incubação verificou-se a presença de colônias lactose positivas, ou seja, colônias negras metálicas ou com o centro negro, com transparência na periferia.

Para dar prosseguimento às demais provas confirmatórias da presença de *E. coli*, foram selecionadas cinco colônias típicas de cada placa com ágar EMB que apresentaram crescimento. Essas colônias, com auxílio da alça bacteriológica de níquel-cromo, foram semeadas, por estrias, em placas de Petri contendo ágar nutriente (AN). Após a semeadura as placas foram incubadas de forma invertida, em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas.

A partir das colônias isoladas em placas com AN, foi realizada a coloração de Gram para observação de bastonetes Gram-negativos, bem como as provas do IMViC para confirmação da presença de *E. coli*, inoculando-se, com auxílio de alça bacteriológica:

- Tubos com 5,0 mL de caldo triptona: após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Completado o período de incubação, realizou-se a leitura adicionando-se em cada tubo  $\pm$  0,3 mL de reativo de Kovacs, agitando-os e deixando-os em repouso por 10 minutos. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram a formação do anel de coloração vermelho escura indicando a reação Indol positivo;

- Tubos contendo citrato de Simmons inclinado: após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Completado o período de incubação, realizou-se a leitura, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram alteração da cor verde para azul, indicando a metabolização do citrato;

- Tubos contendo 7,0 mL de caldo vermelho de metila e Voges-Proskauer (VM-VP): após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 48 horas. Completado o período de incubação, foram pipetados 2,0 mL e 5,0 mL do caldo para dois tubos de ensaio esterilizados. No primeiro tubo, adicionou-se 0,6 mL de solução alcoólica de alfa-naftol a 5,0% e 0,2 mL de solução

aquosa de KOH a 40,0%. Os tubos sofreram forte agitação e deixados em repouso por uma a duas horas. Após esse período, realizou-se a leitura: no primeiro tubo, a reação foi considerada positiva pelo aparecimento da cor vermelha tijolo indicando a produção da acetoina. Incubou-se o restante por mais 48 horas e após esse período adicionou-se três gotas de vermelho de metila, a reação foi considerada positiva pelo aparecimento de coloração vermelha indicando a produção de ácidos mistos a partir da glicose.

Foram consideradas positivas as colônias que apresentaram os seguintes resultados nas provas descritas:

- Coloração de Gram – bastonetes retos não esporulados, Gram-negativos
- Caldo EC – fermentação da lactose +
- Caldo triptona – presença do Indol +
- Caldo VM – presença de acidez +
- Caldo VP – ausência de reação -
- Ágar citrato de Simmons – mudança do indicador +

#### **4.5.3 Antibiograma**

Como teste fenotípico de tipificação bacteriana, foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos utilizando-se a técnica de difusão de disco em placas (Bauer et al. 1966). Os antimicrobianos testados foram: ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina. A leitura baseou-se nos padrões estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003).

#### 4.5.4 Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE)

O perfil genético dos isolados de *E. coli* foi determinado por eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) após a macrorrestrição do DNA pela endonuclease *Xba* I, utilizando o aparelho CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) seguindo o protocolo estabelecido por Pfaller et al. (1992), com modificações.

Foi semeada uma colônia em 3000 µL de caldo TSB e incubado a 37°C por 18 horas. Após a incubação, 500 µL do cultivo foi centrifugado a 6.000 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 300 µL de tampão TEN (Tris pH 7.5, 50 mM, EDTA pH 7.5, 50 mM e cloreto de sódio 150 mM) e acrescido de 340 µL de agarose SeaKem Gold a 1,2%. Esta mistura foi colocada em três moldes de blocos, aguardando a solidificação a 5°C por quinze minutos.

Após a solidificação os blocos foram transferidos para tubos com 1300 µL de tampão EC (Tris pH 7.5, 1M, NaCl, 50 mM, EDTA pH 7.5, 50 mM, desoxicolato de sódio 0.2%, N-lauril sarcosil 0.5% e Brij 58 0.5%) adicionado de 200 µL de solução de lisozima (10 mg/mL) e incubados a 37°C por 5 horas. Após a incubação, os blocos foram enxaguados com 1500 µL de tampão CHEF TE 1X (EDTA pH 7.5, 50 mM e Tris pH 7.0, 1M) e lavados com este mesmo tampão por mais quatro vezes com intervalo de 30 minutos.

Em seguida o CHEF TE 1X foi aspirado dos tubos e os blocos foram cobertos com 1400 µL de tampão ES (EDTA pH 9,3, 625 mM e N-lauril sarcosil 5%) e com 100 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL) e incubados a 50°C durante a noite. Na manhã seguinte o tampão ES foi aspirado e os blocos foram enxaguados com 1500 µL de tampão CHEF TE 1X e lavados com este mesmo tampão por mais quatro vezes com intervalo de uma hora a cada lavagem. Após a

última lavagem foi cortado aproximadamente um terço de cada bloco/isolado para a digestão, enxaguado com 200 µl de tampão DNS (Tris pH 8.0, 1M e cloreto de magnésio 1M) e incubado em temperatura ambiente por uma hora em 200 µL deste tampão. Completado o tempo de incubação os blocos foram lavados com 200 µL deste último tampão por mais quatro vezes com intervalo de uma hora por lavagem. O DNS foi aspirado sendo colocado em cada bloco 50 µL do tampão da enzima de restrição *Xba* I e incubado a 5°C por uma hora para estabilização. Em seguida foi aspirado este tampão e colocado 50 µL do tampão da enzima com 2 µL da enzima *Xba* I por bloco e incubado a 5°C por duas horas e após esse tempo seguiu para a incubação em banho-maria a 37°C por 20 horas.

O DNA digerido nos blocos foi separado pelo PFGE por 19 horas usando agarose para PFGE a 1,0% em 120 mL de tampão TBE 0,5X (TBE 10X = EDTA 2 mM; Tris base pH 8.4, 89 mM; ácido bórico 89 mM) nas seguintes condições: 14°C, 6 V cm<sup>-1</sup>, pulso inicial 5,0 e pulso final 60 no aparelho CHEF DR-II. O marcador molecular *lambda ladder* (Bio-Rad) foi incluído em cada gel. Após o tempo de corrida o gel foi corado com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) por uma hora, visualizado em transiluminador e fotografado sob luz UV.

Segundo os critérios de interpretação definidos por Tenover et al. (1995), os isolados de *E. coli* foram agrupados em cepas idênticas ou relacionadas, pela comparação das bandas obtidas na eletroforese utilizando a inspeção visual das fotografias e o *software* para análise em computador (BioNumerics, v. 4.0; Applied Maths, Kortrijk, Belgium) com tolerância de 0,5% para otimização e de 1,0% para comparação de bandas. Um pulsotipo (PT) foi definido como um único perfil eletroforético, assim os isolados com perfis de restrição idênticos foram considerados do mesmo tipo e identificados com uma letra maiúscula. Cepas com perfil de eletroforese com uma a três bandas diferentes foram consideradas

fortemente relacionadas e classificadas como subtipos (ST) indicados no dendrograma com a letra maiúscula seguida de numeral arábico. Os isolados com mais de três bandas diferentes foram considerados tipos diferentes. A comparação entre isolados de diferentes géis foi possível pela inclusão, em cada gel, de um isolado com o perfil PFGE previamente conhecido. Para determinação da similaridade entre as cepas foi utilizado o coeficiente Dice e o dendrograma foi criado pelo método UPGMA (*Unweighted-pair group methods with arithmetic averages*). Baseado em *cutoff* de 80% de similaridade foram definidos os *clusters* identificados com numerais arábicos.

#### 4.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo é resultado de um projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás – COEP/UFG, conforme parecer consubstanciado com protocolo nº 007 de 14/02/2005 (Anexo 1).

Todos os manipuladores de alimentos do laticínio investigado foram procurados previamente, para esclarecimento sobre as características do estudo e assim, preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acco M, Ferereira FS, Henrique JAP, Tondo EC 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol* 20: 489-493.
2. Adak G, Long S, O'Brien S 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51: 832-841.
3. Adesiyum AA, Webb, LA, Romain HT 1998. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *J Food Protect* 61: 629-632.
4. Afonso Neto MJ 1984. Um lugar à mesa para os produtos lácteos. *Informe Agropecuário* 10: 1.
5. Allerberger F, Wagner M, Schweiger P, Rammer H-P, Resch A, Dierich MP, Friedrich AW, Karch H 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill* 6: 147-151.
6. Allerberger F, Friedrich AW, Grif K, Dierich MP, Dornbusch H-J, Mache CJ, Nachbaur E, Freilinger M, Rieck P, Wagner M, Caprioli A, Karch H, Zimmerhackl LB 2003. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int J Infect Dis* 2: 42-45
7. Almeida AC, Mendes CPA, Silva DB 2005. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. *Hig Alimentar* 19: 81-88.



15. Avery SM, Liebana E, Hutchison ML, Buncic S 2004. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O1257 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans. *Int J Food Microbiol* 92: 161-169.
16. Babák V, Schlegelová J, Vlková H 2005. Interpretation of the results of antimicrobial susceptibility analysis of *Escherichia coli* isolates from bovine milk, meat and associated foodstuffs. *Food Microbiol* 22: 353-358.
17. Baird-Parker AC 1994. Foods and microbiological risks. *Microbiology* 140: 687-695.
18. Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM 1994. Laboratory Investigation of a Multistate Food-Borne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Phage Typing. *J Clin Microbiol* 32: 3012-3017.
19. Barros PCOG, Nogueira LC, Rodriguez EM, Chiappini CCJ 2004. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. *Hig Alimentar* 18: 57-66.
20. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *A J Clin Pathol* 45: 493-496.
21. Bean NH, Goulding JS, Daniels MT, Ângulo FJ 1997. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988 – 1992. *J Food Protect* 60: 1265-1286.
22. Bellizzi A, Santos CL, Costa EQ, Verruma-Bernardi MR 2005. Treinamento de Manipuladores de Alimentos: uma revisão de literatura. *Hig Alimentar* 19: 36-48.

23. Benedetti E, Pedroso DSG 1996. Efeitos da ordenha mecânica sobre a saúde do úbere. *Vet Notícias* 2: 51-60.
24. Berthelot X, Bergoner D 1993. Mastites e qualidade do leite. *A Hora Veterinária* 79: 59-66.
25. Bettelheim KA, Kuzevske A, Gilbert RA, Krause DO, MsSweeney CS 2005. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *J Appl Microbiol* 98: 699-709.
26. Beutin L, Geier D, Steinruch H, Zimmermann S, Scheutz F 1993. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like-toxin)-producing *E. coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 31: 2483-2488.
27. Beutin L, Muller W 1998. Cattle and verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), and old relationship? *The Vet Rec* 142: 283-284.
28. Bidet P, Kurkdjian PM, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, Bingen E 2005. Characterization of *Escherichia coli* O 157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J Med Microbiol* 54: 71-75.
29. Bieber D, Ramer SW, Wu C-Y, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK 1998. Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280: 2114-2118.
30. Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, De Ryck R, Hauser PM, Petignat C, Francioli P 2001. Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 39: 3442-3445.
31. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Fernandez I, Rio M 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype

- O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol Infect* 117: 251-257.
32. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, Gonzalez EA, Bernárdez MI, Blanco J 2003. Sorotypes Virulence Genes and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* isolates from Healthy Sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 41: 1351-1356.
  33. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzol F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CI 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37: 447-503.
  34. Bonfoh B, Wasen A, Traoré NA, Fane A, Spillmann H, Simbé CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J 2003. Microbiological quality of cow`s milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control* 14: 495-500.
  35. Bottone EJ 1997. *Yersinia enterocolítica*. The charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 10: 257-276.
  36. Brasil 1996. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução MERCOSUL/GMC/RES nº145 de 13 de dezembro de 1996. *Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal*.
  37. Brasil 2001. MS. Resolução-RDC ANVISA/MS nº 12, de 02 de janeiro de 2001.
  38. Brasil 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 51 de 18 de setembro de

2002. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado*. Anexo V.
39. Brasil 2006. Sistema de Vigilância em Saúde (SVS)/MS – Estatísticas de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>. Acesso em: 02/03/2006.
40. Brito MAVP, Charles TP 1995. In Brito JF, Dias JC *Sanidade do gado leiteiro*. Coronel Pacheco, EMBRAPA – CNPGL, Tortuga, São Paulo, p. 63-70.
41. Brod FCA, Varaschin EB, Cabral SO, Fiorentini A 2002. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de lanches comercializados em vias públicas em cidades da Região Fronteira Noroeste/RS. XVIII Congresso *Brasileiro de Ciência e Tecnologias de Alimentos*, Porto Alegre-RS. p. 3685.
42. Bryan FL, Jermini M, Schmitt R, Chilufya EN, Mwanza M, Matoba A 1997. Hazards associated with holding and reheating foods at vending sites in a small town in Zambia. *J Food Protect* 60: 391-398.
43. Câmara SAV, Amaral GB, Muller MT, Silveira KCS, Almeida, TN, Medeiro CF 2002. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. *Hig Alimentar* 16: 32-36.
44. Cardoso RCV 1999. Avaliação do grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes de pólo petroquímico de Camaçari. *Curso de especialização em controle de qualidade dos alimentos*, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

45. Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Zanatta, GF 2001. Avaliação as susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. *Arq Inst Biol* 60: 1-5.
46. Cardoso L, Araújo WMC 2004. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001. *Hig Alimentar* 18: 49-53.
47. Carlos LA, Cordeiro CAM, Folly MM, Martins MLL 2004. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo "C" comercializado no Município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Hig Alimentar* 18: 57-66.
48. Catão RMR, Ceballos BSO 2001. *Listeria* spp., Coliformes Totais e Fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc Tecnol Aliment* 21: 281-287.
49. Cavalli SB 2001. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. *Rev de Nutrição* 14: 41-46.
50. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - Manual das doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <http://www.cve.saúde.sp.gov.br>. Acesso em 25/03/2004.
51. Cerqueira AMF, Guth BEC, Joaquim RM, Andrade JRC 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol* 70: 111-121.
52. Chye FY, Abdullah A, Ayob MK 2004. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol* 21: 535-541.

53. Chao KL, Dreyfus LA 1997. Interaction of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin B with Cultured Human Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun* 65: 3209-3217.
54. Cobbold R, Desmarchelier P 2000. A longitudinal study of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol* 71: 125-137.
55. Coia, EJ 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immun Med Microbiology* 20: 1-9.
56. Coia JE, Johnston Y, Steers NJ, Hanson MF 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int J Food Microbiol* 66: 63-69.
57. Costa FN, Lima RMS, Rabelo RN 2002. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus coagulase positivo*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. *Hig Alimentar* 16: 80-83.
58. Council for Agricultural Science and Technology (CAST) 1994. *Foodborne pathogens - risks and consequences*, Task Force Report, n.122. Ames. 87p.
59. Cowden JM, Wall PG, Adak G, Evans H, Le Baigue S, Ross D 1995. Outbreaks of foodborne infectious intestinal disease in England and Wales: 1992 and 1993. *Commun Dis Report* 5: 109-117.
60. Crane JK, Wehner MS, Bolen EJ, Sando JJ, Linden J, Guerrant RL, Sears CL 1992. Regulation of Intestinal Guanylate Cyclase by the Heat-Stable Enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. *Infect Immun* 60: 5004-5012.

61. Curtis ML, Franceschi O, Castro N 2000. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos em comedores de empresas privadas. *Arch Latinoam Nutr* 50: 177-182.
62. Dean P, Maresca M, Kenny B 2005. EPEC's weapon of mass subversion. *Curr Op Microbiol* 8: 28-34.
63. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* 67: 1-17.
64. Dickinson BL, Clements JD 1995. Dissociation of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Adjuvanticity from ADP-Ribosyltransferase Activity. *Infect Immun* 63: 1617-1623.
65. Donnenberg MS, Whittam TS 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Investig* 107: 539-548.
66. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*: American Society for Microbiology, Washington, DC. p.171-191.
67. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) 2005a. Brasil – produção, importação, exportação e consumo de leite. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br>. Acesso em: 03/04/2006.
68. EMBRAPA 2005b. Produção brasileira de queijo – (toneladas). Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br>. Acesso em: 04/04/2006.

69. Espié E, Vaillant V, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Martin-Schaller R, De Valk H, Vernozy-Rozand C 2005. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect* 00: 1-4.
70. Fagundes CM, Fischer V, Silva WP, Carbonera N, Araújo MR 2006. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural* 36: 568-572.
71. Fang W, Pyorala S 1996. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. *J dairy Sci* 79: 76-82.
72. Feniman CM, Pasini G, Mucelin CA 2003. Avaliação Microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira-PR. *Hig Alimentar* 17: 77-86.
73. Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect* 119: 261-269.
74. Food & Drug Administration (FDA) 2002. Bacteriological Analytical Manual online. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4html). Acesso em 19/02/2003.
75. Foxman B, Riley LW 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 153: 1135-1141.
76. Freitas AC, Nunes MO, Milhomem AM, Ricciardi ID 1993. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil. *J Food Protect* 56: 62-65.

77. Gannon VPJ, Rashed M, King RK, Golsteyn TEH 1993. Detection and characterization of *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *E. coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 1268-1274.
78. Garboggini ILA, Gallo CR 1998. Pesquisa de *Salmonella*, *Campylobacter*, Coliformes totais e *Escherichia coli* em Águas Nascentes (Bicas) em Piracicaba – SO. *XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologias de Alimentos*, Rio de Janeiro-RJ. p. 982-985.
79. Garrido NS, Moraes JMT, Briganti RC, Oliveira MA, Bergamini AMM, Oliveira SAV, Fávaro RMD 2001. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 60: 141-146.
80. Germano MIS 2003. *Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde*. Varela, São Paulo. 165p.
81. Giraldi R, Guth BEC, Trabulsi LR 1990. production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. *J. Clin Microbiol* 28: 1460-1462.
82. Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710-713.
83. Góes JAW 2001. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. *Hig Alimentar* 15: 20-22.
84. Gonzalez AM, Rosa ACP, Andrade JRC, Tibana A 2000. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Microbiol* 17: 321-328.

85. Goñi P, Vergara Y, Ruiz J, Vila J, Gómez-Lus R 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int J Antimicrob Agents* 23: 268-272.
86. Goosney DL, DeVinney R, Pfeutzner R, Frey E, Strynadka NC, Finlay BB 2000. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actin. *Curr Biol* 10: 735-738.
87. Grif K, Karch H, Schneider C, Daschner FD, Beutin L, Cheasty T, Smith H, Rowe B, Dierich MP, Allerberger F 1998. Comparative Study of Five Different Techniques for Epidemiological Typing of *Escherichia coli* O157. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32:165-176.
88. Guth BEC, Giraldi R, Gomes TAT, Marques LRM 1994. Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC adherence factor (EAF) sequences. *Can J Microbiol* 40: 341-344.
89. Hales BA, Hart CA, Matt RM, Saunders JR 1992. The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid* 28: 183-193.
90. Hall G, Kirk MD, Becker N, Gregory JE, Inibomb L, Millard G, Stafford R, Lalor K 2005. Estimating Foodborne Gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis* 11: 1257-1264.
91. Hahn BK, Maldonado Y, Schreiber E, Bhunia AK, Nakatsu CH 2003. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. *J Microbiol Meth* 53: 387-399.

92. Hiluy DJ, Pinheiro HCG, Norões SMRA 1996. A Vigilância Sanitária e o Código de Defesa do Consumidor. *Hig Alimentar* 10: 88-89,
93. Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, Van Lierde S, Van Eldere J 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 35: 2514-2520.
94. Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Fazio MLS 1999. Microbiologia do leite pasteurizado tipo "C", comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. *Hig Alimentar* 13: 51-54.
95. Holland RE, Wilson RA, Holland MS, Yazbasiyan-Gurkan V, Mullaney TR, White DG 1999. Characterization of *eae*<sup>+</sup> *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrhoeic calves. *Vet Microbiol* 66: 251-263.
96. Jablonski LM, Bohach GA 1997. *Staphylococcus aureus*. In Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 353-375.
97. Jackson TC, Marshall DL, Acuff GR, Dickson JS 2001. Meat, poultry and seafood. In Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2<sup>nd</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 91-109.
98. Johnston AM 1990. Foodborne illness. Veterinary sources of food illness. *Lancet* 336: 856-858.
99. Kaper JB 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr Op Microbiol* 1: 103-108.

100. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.
101. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinsheid DJ, Frey EA, Finlay BB 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cell. *Cell* 91: 511-520.
102. Khan A, Das SC, Ramamurthy T, Sikdar A, Khanam J, Yamasaki S, Takeda Y, Balakrish Nair G 2002. Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Molecular Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diverse Sources in Calcutta, India. *J Clin Microbiol* 40: 2009-2015.
103. Klein G, Bulte M 2003. Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces. *Food Microbiol* 20: 27-33.
104. Kluytmans J, Leeuwen WV, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, Leeuwen NV, Belkum AV, Verbrugh H 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno - and genotyping. *J Clin Microbiol* 33: 1121-1128.
105. Konowalchuk J, Speirs JL, Stavric S 1977. Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18: 775-779.
106. Kottowitz LBM, Guimarães IM 2003. Avaliação microbiológica de queijos coloniais produzidos no estado do Paraná. *Hig Alimentar* 17: 77-80.
107. Krug EEB 2006. Avaliação e perspectivas do mercado de leite para 2006. Disponível em <http://www.infoleche.com/www/contenido//>. Acesso em: 04/04/2006.

108. Labarca J 2002. Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev Chil Infectol* 19: 157-160.
109. Lazaro NS 1994. Comportamento de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos frente a antimicrobianos. *Rev B Med Vet* 16: 198-201.
110. Le Loir Y, Baron F, Gautier M 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen Mol Res* 2: 63-76.
111. Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S 1999. Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283: 806-9.
112. Levine MM 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherence. *J Infect Dis* 155: 377-389.
113. Liesegang A, Sachse U, Prager R, Claus H, Steinrück H, Aleksic S, Rabsch W, Voigt W, Fruth A, Karch H, Bockemühl J, Tschäpe H 2000. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H – in Germany – a ten-year study. *Int J Med Microbiol* 290: 269-278.
114. Lima VLAG, Melo EA, Sena EM 1998. Condições higiênico-sanitárias de “Fast-food” e restaurantes da região metropolitana do Recife-PE. *Hig Alimentar* 12: 51-54.
115. Lior H 1996. Classification of *Escherichia coli*. In Gyles CL *Escherichia coli* in domestic animals and humans: CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 31-72.
116. Lira WM, Macedo C, Marin JM 2004. The incidence of Shiga toxin –producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J Appl Microbiol* 97: 861-866.

117. Loguercio AP, Aleixo JAG 2001. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural* 31: 1063-1067.
118. Maciel CHP, Pinheiro MS, Vilas Boas GV 2002. Detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em manipuladores de alimentos de uma indústria de linguiça do estado do Rio de Janeiro. *XVIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre-RS. p. 3240.
119. Mainil JG, Daube G 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* 98: 1332-1344.
120. Maldonado Y, Fiser JC, Nakatsu CH, Bhunia AK 2005. Cytotoxicity Potencial and Genotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Environmental and Food Sources. *Appl Env Microbiol* 71: 1890-1898.
121. Martin BS, Kruze J, Morales MA, Agüero H, Iraguen D, Espinoza S, Leon B, Borie C 2002. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from dairy herds in Chile. *J Appl Res Vet Med* 1: 1-13.
122. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD 1993. Molecular Epidemiology: Application os Contemporary Techiques to the Typing of Microorganisms. *Clin Inf Dis* 17: 153-164.
123. Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK 1996. Rapid Preparation of Bacterial DNA for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34: 2598-2600.
124. McDaniel TK, Kaper JB 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 23: 399-407.
125. Mead PS, Griffin P 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352: 1207-1212.

126. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
127. Medeiros NGA, Carvalho MGX, Santos MGO, Lima SCP 2004. Detecção de antibióticos no leite *in natura* consumido no Município de Patos, Paraíba. *Hig Alimentar* 18: 85-88.
128. Mendes ML, Oliveira GN, Souza GC 2002. Avaliação de mãos de manipuladores de merenda escolar em escolas estaduais do município de Limoeiro do Norte-CE. *XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre-RS. p. 3652.
129. Mezolf AG, Giannella RA, Eade MN, Cohen MB 1992. *Escherichia coli* enterotoxin (STa) binds to receptors, stimulates guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. *Gastroenterology* 102: 816-822.
130. Midura TF, Bryant RG 2001 Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In *Compendium of methods for the microbiological examination for foods*, American Public Health Association, Washington, DC. p.13-23.
131. Monteiro MCN, Timbó MOPP, Oliveira SCA, Costa LAT 2001. Controle higiênico-sanitário de manipuladores de alimentos de cozinhas industriais do estado do Ceará. *Hig Alimentar* 15: 90-93.
132. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A 2002. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 40: 2119-2125.

133. Moraes I R 1999. Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: manipulação de alimentos. Disponível em <http://www.cve.saúde.sp.gov.Br>. Acesso em 23/03/2006.
134. MS 2006. Brasil – Guia Alimentar para crianças maiores de dois anos. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>. Acesso em: 10/04/2006.
135. Nataro JP, Kaper JB 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol* 11: 142-201.
136. Nataro JP, Maher KO, Mackie P, Kaper JB 1987. Characterization of Plasmids Encoding the Adherence Factor of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 55: 2370-2377.
137. NCCLS 2003. Approved Standard M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 47p.
138. Notermans S, Borgdorff M 1997. A global perspective of foodborne disease. *J Food Protect* 60: 1395-1399.
139. O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, Jackson MP, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg AA, Keusch GT 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immun* 180: 65-94.
140. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 146: 763-769.
141. Okura MH, Ávila FA 2004. Isolamento de enteropatógenos em leite cru produzido nas Micro-Regiões do Triângulo Mineiro–MG. *Fazu em Revista* 1: 11-20.

142. Olive DM, Bean P 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.
143. Oliveira AM, Gonçalves MO, Shinohara NKS, Stamford TLM 2003. Manipuladores de alimentos. Um fator de risco. *Hig Alimentar* 17: 12-19.
144. Organização Mundial de Saúde (OMS) 1989. Métodos de vigilância sanitária y de gestión para manipuladores de alimentos: Informe de una reunión de consulta de la OMS, Ginebra. Disponível em: <http://www.who.int/whqlibdoc.who.int/>. Acesso em: 03/12/2005.
145. OMS 1997. Report of the WHO meeting on the medical impact of the use of antimicrobials in food animals, October 13-17, Berlin.
146. OMS 2003. Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of practice general principles of food hygiene. Rev 4. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/>. Acesso em 20/02/ 2005.
147. Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, Horng CB 1997. Food-Borne Disease Outbreaks Due to Bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J Clin Microbiol* 35: 1260-1262.
148. Panetta JC 2000. Clandestinidade ameaça cadeia produtiva de alimentos. *Hig Alimentar* 14: 3.
149. Panorama do Leite no Brasil 1997. *Revista dos Criadores* 66: 20-24.
150. Parrila-Cerrillo IF, Vazquez-Castellanos J L, Saldate-Castaneda EO, Nava-Fernandez LM 1993. Brotes de tox infecciones alimentaris de origem microbiano y parasitario. *Sal Pub Mexico* 35: 456-463.

151. Pereira ML, Gastelois MCA, Bastos EMAF, Caiaffa, WT, Faleiro ESC 1999. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 51: 427-431.
152. Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS 1992. Molecular Biology – PFGE Analysis of Chromosomal Restriction Fragments. In Inseberg HD *Clinical Microbiology Procedures Handbook*: ASM, Washington, DC. p.10.5.c.1-10.5.c.11.
153. Picozzi C, Foschino R, Heuvelink A, Beumer R 2005. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Lett Appl Microbiol* 40: 491-496.
154. Pinto AFMA 2004. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. Disponível em <http://www.ipv.pt/millennium>. Acesso em 09/10/2004.
155. Pinto RG, Ornelas EA, Tomich TR, Pereira AJG 2001. Avaliação da higienização das mãos dos manipuladores em uma indústria de pão de queijo. *XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Foz do Iguaçu-PR. p. 416.
156. Radu S, Ling OW, Rusul G, Karim MIA, Nishibuchi M 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J Microbiol Meth* 46: 131-139.
157. Rahn K, Renwick SA, Jonson RP, Wilson JB, Clarke, RC, Alves D, McEwen S, Lior H, Spika J 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidem Infect* 119: 251-259.
158. Raimundo SMC 1992 Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal no comércio do Rio de Janeiro. *Rev Inst Lat Cândido Tostes* 47:169-173.

159. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603-609.
160. Rêgo JC, Pires EF, Medina GPO 1999. Treinamento como instrumento de qualidade higiênica, em Unidade de Alimentação e Nutrição Hospitalar. *Hig Alimentar* 13: 81-86.
161. Régua-Mangia AH, Guth BC, Andrade JRC, Irino K, Pacheco ANF, Ferreira LCS, Zahner V, Teixeira LM 2004. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. *Immun Med Microbiol* 40: 155-162.
162. Reibnitz MGR, Tavares LBB, Garcia JA 1998. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulase y DNAsa positivos em queso 'Colonial' comercializado in el município de Blumenal, Estado de Santa Catarina, Brasil. *Rev Argent Microbiol* 30: 8-12.
163. Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Setander RK, Whittam TS 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406: 64-67.
164. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD 1983. Outbreaks of hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308: 681-885.
165. Ritter R, Santos D, Bergmann GP 2001. Análise da Qualidade Microbiológica de queijo Colonial, Não Pasteurizado, Produzido e Comercializado por Pequenos Produtores, no Rio Grande do Sul. *Hig Alimentar* 15: 51-55.
166. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM, Benembarek PK 2004. A review of outbreaks of foodborne disease associated

- with passenger ships: Evidence for risk management. *Pub Health Rep* 119: 427-434.
167. Roos TB, Filho VBS, Timm CD, Oliveira DS 2005. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. *Hig Alimentar* 19: 94-96.
168. Rosa ACP, Mariano AT, Pereira MAS, Tibana A, Gomes TAT, Andrade JRC 1998. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 47:781-790.
169. Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, Richard N 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int J Food Microbiol* 35: 213-221.
170. Rouquayrol MZ, Filho NA 2003. Epidemiologia e saúde. 6ª ed. Maedsi, São Paulo. 728p.
171. Russo TA, Johnson JR 2000. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181: 1753-1754.
172. Sakuma M, Urashima M, Okabe N 2006. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, Japan, 1999-2004. *Emerg Infect Dis* 12: 323-325.
173. Salles RK, Goulart R 1997. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Rev Saúde Pública* 3: 131-139.
174. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 173:1019-1022.

175. Schouten JM, Bouwknecht M, van de Giessen AW, Frankena K, De Jong MCM, Graat EAM 2004. Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Prev Vet Medicine* 64: 49-61.
176. Schroeder CM, White DG, Ge B, Zhang Y, McDermott PF, Ayres S, Zhao S, Meng J 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *Int J Food Microbiol* 85: 197-202.
177. Schroeder CM, White DG, Meng J 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol* 21: 249-255.
178. Schwartz DC, Cantor CR 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
179. Sears CL, Kaper JB 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 60: 167-215.
180. Senna JPM, Pinto CA, Carvalho LPS, Santos DS 2002. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 40: 2254-2256.
181. Sgarbieri VC 1993. Processamento de alimentos e nutrição. *Rev Nutrição da PUCCAMP* 6: 97-114.
182. Silva Jr EA 2005. Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação. 6ª ed. Livraria Varela, São Paulo, 623p.

183. Silva JA, Silva WD 2005. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa eritrócitos. *Rev Patologia Tropical* 34: 175-196.
184. Silva N 1999. Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. *Encontro de Pesquisadores em Mastites* 3, Botucatu-SP. p. 51-55.
185. Simone E, Goosen M, Notermans SHW, Borgdorff MW 1997. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. *J Food Protect* 60: 442-446.
186. Singer RS, Sisco WM, Carpenter TE 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 42: 5502-5511.
187. Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, Hol WG 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxina, a close relative of colera toxina. *J Mol Biol* 230: 890-918.
188. Shopsisin B, Kreiswirth BN 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7: 323-326.
189. Sohel I, Puente JL, Ramer SW, Bieber D, Wu C-Y, Schoolnik GK 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* 178: 2612-2628.
190. Souza EL, Silva CA, Sousa CP 2004. Qualidade sanitária de equipamentos, superfícies, água e mãos de manipuladores de alguns estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de João Pessoa, PB. *Hig Alimentar* 18: 98-102.

191. Srinivasan V, Gillespie BE, Nguyen LT, Lewis MJ, Schukken YH, Oliver SP 2004. Phenotypic And Genotypic Antibiotic Resistance Patterns Of *Escherichia coli* Isolated From Dairy Cows With Mastitis. *Annual Meeting Proceedings*, Charlotte, North Carolina. p. 371-372.
192. Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, Sonnenberg MS 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* 20: 325-337.
193. Struelens MJ 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 2: 50-59.
194. Sweeney NJ, Klemm P, McCormick BA, Moller-Nielsen E, Utley M, Schembri MA, Laux DC, Cohen PS 1996. The *Escherichia coli* K-12 *gntP* Gene Allows *E. coli* F-18 to Occupy a Distinct Nutritional Niche in the Streptomycin-Treated Mouse Large Intestine. *Infect Immun* 64: 3497-3503.
195. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
196. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 426-439.
197. Tondo EC, Guimarães MC, Henriques JA, Ayub MA 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol* 46: 1108-1114.

198. Tosin I, Silbert S, Sader HS 2003. The Use of Molecular Typing to Evaluate the Dissemination of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Rods in Brazilian Hospitals. *B J Infect Dis* 7: 360-369.
199. Valquez-Moreno L 1990. Antibiotic residues and drug resistant bacteria in beef and chicken tissues. *J Food Select* 55: 632-634.
200. van Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14: 547-560.
201. VanderBergh FQ, Yzerman EPF, Van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37: 3133-3140.
202. Vanderlinde PB, Fegan N, Mills L, Desmarchelier PM 1999. Use of pulse field gel electrophoresis for the epidemiological characterisation of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from meat workers and beef carcasses. *Int J Food Microbiol* 48: 81-85.
203. Varnan AH, Evans MG 1991. *Foodborne pathogens – an illustrated text*. Wolfe Publishing. New York. p.221-228.
204. Wagner M, Allerberger F, Manafi M, Lindner G, Friedrich AW, Sonntag AK, Foissy H 2004. Characterization of Pathogenic *Escherichia coli* isolated from Humans in Austria: Phenotypes, Toxin Gene Types and Epidemiology. *J Vet Med B* 51: 288-292.
205. Wani AS, Bhat MA, Samanta I, Nishikawa Y, Buchh AS 2003. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and

- enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhea in India. *Lett Appl Microbiol* 37: 121-126.
206. Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K 1996. Outbreak of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in two different genotype strains in Japan. *Lancet* 348: 831-832.
207. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK 1991. Isolation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Shiga-Like-Producing *Escherichia coli* from Dairy Cattle. *J Clin Microbiol* 29: 985-989.
208. Weiner M, Osek J 2003. Comparison of arbitrary primer (AP) PCR and Pulsed-field gel electrophoresis methods for genotypic differentiation of *Escherichia coli* O157 strains. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 262-275.
209. Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov F, Orskov I, Wilson RA 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic and infantile diarrhea. *Infect Immun* 61: 1619-1629.
210. Wieler LH, Vieler E, Erpenstein C, Schlapp T, Steinbrück H, Bauerfeind R, Byomi A, Baljer G 1996. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Bovines: Association of Adhesion with Carriage of *eae* and Other Genes. *J Clin Microbiol* 34: 2980-2984.
211. Winarno FG 1992. Food safety standards and regulations 3<sup>rd</sup> World Congress of Foodborne Infections And Intoxications, Berlin. p.841-844.
212. Witte W 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997.

213. Wood PK, Morris JG, Small PL, Sethabutr O, Toledo MR, Trabulsi L, Kaper JB 1986. Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 24: 498-500.
214. Yamamoto T, Echeverria P 1996. Detection of the Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene Sequences in Enterotoxigenic *E. coli* Strains Pathogenic for Humans. *Infect Immun* 64: 1441-1445.
215. You JY, Moon BM, Oh IG, Baek BK, Li LG, Kim BS, Stein BD, Lee JH 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 from cattle in Korea. *Int J Food Microbiol* 106: 74-78.
216. Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking, Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *J Clin Microbiol* 40: 3894-3902.
217. Zhao S, White DG, Ge B, Ayers S, Friedman S, English L, Wagner D, Gaines S, Meng J 2001. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Appl Environ Microbiol* 67: 1558-1564.

ARTIGO 1

Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, leite cru e queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil

Este artigo foi enviado e aceito para publicação pela Revista Ciência Rural

(Anexo 2)

**Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, leite cru e queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil**

**Phenotypic characterization by antibiogram of *Escherichia coli* strains isolated from handlers, raw milk and “Minas Frescal” cheese samples in a dairy process plant in Goiás, Brazil**

Maria Raquel Hidalgo Campos<sup>1</sup>; André Kipnis<sup>2</sup>; Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André<sup>2</sup>; Carla Atavila da Silva Vieira<sup>2</sup>, Liana Borges Jayme<sup>1</sup>; Patrícia Pimentel Santos<sup>2</sup>; Álvaro Bisol Serafini<sup>2</sup>

**RESUMO**

Este trabalho objetivou caracterizar fenotipicamente isolados de *Escherichia coli* a partir de amostras obtidas de mão e nariz de manipuladores, de leite cru e de queijo Minas Frescal produzidos em um laticínio em Goiás, Brasil, visando estabelecer uma relação de contaminação entre o manipulador e/ou a matéria-prima e o produto final. Foram coletadas 24 amostras de leite cru e de queijo Minas Frescal, 46 swabs de mãos e 46 de nariz dos manipuladores envolvidos na fabricação do queijo, no período entre março/2004 e fevereiro/2005. As 69 cepas isoladas foram submetidas ao teste de suscetibilidade a seis antimicrobianos (ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina) e a partir deste, foi possível agrupá-las em 17 diferentes perfis fenotípicos (A–Q). Somente um perfil fenotípico (E) foi semelhante entre cepas de *E. coli* isoladas, tanto de amostra de queijo (14Q<sup>b</sup>) como de um dos manipuladores (10M<sup>1</sup>). Tal resultado sugere uma possível contaminação do produto durante a sua manipulação, portanto, apenas neste caso pôde-se estabelecer a origem da *E. coli* para o queijo. Nas demais situações, não foi possível determinar a fonte da bactéria para o queijo. Conclui-se que o antibiograma não se mostrou um teste eficiente na determinação da fonte de microrganismos para o produto final.

**Palavras-Chave:** Coliformes, manipulação, leite cru, queijo Minas Frescal.

<sup>1</sup> Faculdade de Nutrição / Universidade Federal de Goiás – Goiânia / Goiás / Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás – Goiânia / Goiás / Brasil

Correspondência: Profa. Maria Raquel H. Campos – Rua 23, no. 243 / 704, Setor Central, Goiânia, Goiás, Brasil – 74015-120  
E-mail: raq7@brturbo.com.br

## ABSTRACT

The present work aimed to type *E. coli* strains obtained from handlers hands and noses, raw milk and Minas Frescal cheese produced by a dairy milk processing plant in Goiás, Brazil, to establish a relationship among the sources of *E. coli* and cheese. Twenty-four samples were collected from raw milk and Minas Frescal cheese, 46 from hands and 46 from noses of handlers involved in the cheese manufacturing, between March/2004 and February/2005. All 69 *E. coli* strains isolated were submitted to the susceptibility test for six antimicrobials (ampicillin, cephalothin, ciprofloxacin, gentamicin, trimethopim-sulphamethoxazole and tetracycline). The strains were grouped in 17 different phenotypic susceptibility profiles (A-Q). The test allowed to establish correlation among a cheese strain (14Q<sup>b</sup>) and a handler (10M<sup>1</sup>) strain that presented the same susceptibility profile (E) suggesting a possible product contamination during the handling. In conclusion, the phenotypic susceptibility profiles determined by the antibiogram method failed to establish a correlation between the strains obtained from the probable sources (handlers and milk) and the final products.

**Key Words :** Coliforms, handling, raw milk, Minas Frescal cheese.

## INTRODUÇÃO

O leite, devido à sua composição química, é considerado um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários microrganismos (DOYLE et al., 1997; CHYE et al., 2004). Portanto, o leite deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até o seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais (BONFOH et al., 2003). A composição do leite, sua microbiota natural, a contaminação pós-pasteurização, o processamento e manipulação, os equipamentos, a temperatura inadequada durante estocagem e o transporte podem resultar em altos níveis de microrganismos patogênicos em queijos (ARAÚJO et al., 2002).

No Brasil, a indústria de laticínios é expressiva. Em 2003, foram produzidos 22.254 milhões de litros de leite (IBGE, 2003) e em 2002, foram produzidas 31.762 toneladas de queijo Minas Frescal (BARROS et al, 2004).

O queijo Minas Frescal é um queijo branco, semelhante ao “Queso Blanco”, fabricado em outros países da América Latina, produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, caracterizado por alta atividade água, baixo pH (5,1–5,6) e 1,0 a 6,0% de Cloreto de Sódio (NaCl) (FREITAS et al., 1993). Possui cerca de 43,0% a 55,0% de umidade e uma vida de prateleira de 10 a 14 dias (GONZALEZ et al., 2000). Na sua fabricação utiliza-se coalho enzimático ou químico, remove-se o soro e realiza-se a moldagem e a salga (ARAÚJO et al., 2002). Esse 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; ROOS et al., 2005). Destaca-se que, geralmente, é fabricado a partir de leite cru, sendo um problema em saúde pública, pois constitui-se em veículo para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas, entre eles a *E. coli* (ARAÚJO et al., 2002; SCHOUTEN et al., 2004).

Segundo DE BUYSER et al. (2001), é difícil estimar a proporção de doenças transmitidas por leite e derivados, devido às limitações dos sistemas de vigilância. Na França, o leite e os seus derivados estiveram implicados em 5% dos 3.839 surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem bacteriana entre 1988 e 1997. Neste país dos 60 surtos relatados, 48% foram relacionados ao leite cru, e de 1,0 a 5,0% do total de surtos relatados em outros países como na Escócia, Inglaterra e País de Gales (COWDEN et al., 1995; AMMON, 1997), nos Estados Unidos (BEAN et al., 1997); na Holanda (SIMONE et al., 1997).

No Brasil, tem-se evidenciado a presença de microrganismos patogênicos em queijo Minas Frescal, sendo amplamente reconhecida a presença de coliformes fecais neste produto em vários estudos como em Belo Horizonte/MG (PEREIRA et al., 1999), em Cuiabá/MT (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001), em Poços de Caldas/MG (ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2002), em cidades do interior do Paraná (KOTTWITZ & GUIMARÃES, 2003), no Rio de Janeiro/RJ (BARROS et al., 2004), no Distrito Federal (CARDOSO & ARAÚJO, 2004) e em Três Passos/RS (ROOS et al., 2005).

A *E. coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, sendo uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (BRENER, 1984), sendo isolada com freqüência, em alimentos e produtos lácteos incluindo os armazenados sob refrigeração (NATARO & KAPER, 1998; FDA, 2002).

Nas últimas duas décadas, muitos métodos têm sido aplicados para comparar cepas de *E. coli* na tentativa de identificar os mecanismos de transmissão e fontes de contaminação (ZADOKS et al., 2002). Entre as técnicas fenotípicas utilizadas, o teste de suscetibilidade a antimicrobianos tem sido especialmente usado devido a seu baixo custo, facilidade de execução, além de contribuir para informar sobre a resistência microbiana (KLUYTMANS et al., 1995; ACCO et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotipicamente, através do teste de suscetibilidade *in vitro* as cepas de *E. coli* isoladas das amostras de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal analisadas, e determinar a relação de contaminação, se presente, entre a matéria-prima (leite cru), ou o manipulador e o produto final (queijo).

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de março de 2004 a fevereiro de 2005 foram coletadas 140 amostras em um laticínio no estado de Goiás, sendo: 24 amostras de leite cru (não pasteurizado), 24 amostras de queijo ( $\pm$  500g) e 46 amostras de mãos e 46 de nasofaringe a partir de quatro manipuladores, funcionários da área de processamento de queijo. As amostras foram coletadas quinzenalmente (uma de leite cru, uma de queijo fabricado a partir do mesmo leite coletado, uma da nasofaringe e de uma das mãos de cada manipulador que trabalhava no dia da coleta), segundo os critérios estabelecidos por MIDURA & BRYANT (2001).

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás e basearam-se nas técnicas descritas no FDA (2002). Foram feitas as seguintes determinações: análise presuntiva para coliformes, coliformes fecais e *E. coli*; análise confirmativa para coliformes; completa para *E. coli* (coloração de Gram e provas do IMViC). Como teste fenotípico de tipagem bacteriana, foi realizado o teste de suscetibilidade a antimicrobianos de todos isolados, usando a técnica de difusão em placas segundo NCCLS (2003). Os antibióticos usados foram ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol trimetoprim e tetraciclina. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com os padrões do NCCLS (2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode ser observado que um total de 69 cepas de *E. coli* foram isoladas das 47 amostras positivas de leite cru, queijo Minas Frescal, nasofaringe e mãos de manipuladores do laticínio local do estudo. A presença de diversas cepas de *E. coli* indica que essa contaminação pode ser de origem fecal e,

portanto, esse alimento está em condições sanitárias insatisfatórias, representando risco direto à saúde humana e animal (NATARO & KAPER, 1998; BABÁK et al., 2005).

#### - Contaminação

**Manipuladores** - O laticínio estudado contava, à época da pesquisa, com quatro funcionários que trabalhavam diretamente na fabricação do queijo, codificados em algarismos 1, 2, 3 e 4. Dos quatro manipuladores, três (75,0%) apresentaram-se contaminados pelo menos uma vez nas mãos e/ou nariz durante o período da coleta. Das 46 amostras obtidas da nasofaringe e 46 obtidas a partir das mãos dos manipuladores investigados, foram isoladas 11 (12,0%) cepas de *E. coli*, sendo três (6,5%) da nasofaringe e oito (17,4%) das mãos destes (Tabela 1).

Esses resultados mostram porcentagens de contaminação superiores aos obtidos em outras pesquisas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que 60,0% das doenças de origem alimentar são provocadas por microrganismos, sendo o manipulador o principal veículo dessa transmissão (SILVA JR., 2002). CURTIS et al. (2000) encontraram *E. coli* nas mãos de 21,9% dos manipuladores de um restaurante em Caracas, Venezuela. Já no estudo realizado por CARDOSO (1999) foi encontrada uma porcentagem superior (97,3%) de *E. coli* em mãos de manipuladores de restaurantes da Bahia.

A *E. coli* faz parte da microbiota do trato gastrointestinal humano desde o nascimento. A partir daí, pode disseminar para outras regiões do corpo e conseqüentemente para os alimentos quando produzidos sem os conhecimentos adequados de boas práticas de manipulação (NATARO & KAPER, 1998). De acordo com OLIVEIRA et al. (2003), a *E. coli* está entre os principais responsáveis por surtos de doenças transmitidas por alimentos quando

associados a condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos manipuladores, como falha na higienização das mãos indicando contaminação de origem fecal. Portanto, diante dos resultados encontrados neste estudo, a presença destas bactérias nas mãos e nasofaringe dos manipuladores representa grande importância epidemiológica, devido à possibilidade de transferência das mesmas aos alimentos durante toda a sua cadeia de produção.

**Leite cru** - Das 24 amostras de leite cru coletadas, 19 (79,2%) apresentaram contaminação por *E. coli*, isolando-se 33 cepas. Dados semelhantes foram encontrados em pesquisa realizada por REA et al. (1992) sobre ocorrência de bactérias indicadoras e patogênicas no leite cru na Irlanda, onde evidenciaram coliformes em 100,0% das amostras analisadas, sendo 60,0% delas contaminadas por *E. coli* (Tabela 1).

No Estado de São Paulo, BADINI (1993), observou que de 60 amostras de leite cru, 68,3% apresentaram contagens de microrganismos mesófilos, destes 83,3% foram de coliformes totais e 18,3% de coliformes fecais. CHYE et al. (2004), pesquisando 360 fazendas de gado leiteiro na Malásia, analisaram 930 amostras de leite cru e relataram 90,0% das amostras com coliformes e 65,0% contaminadas por *E. coli* com contagens acima dos padrões permitidos.

Segundo LIRA et al. (2004), a carne bovina e o leite cru têm sido confirmados como as fontes mais prováveis de doenças transmitidas por alimentos em surtos investigados na última década, principalmente no Canadá, Estados Unidos, Reino Unido e Japão. A carga microbiana inicial do leite está diretamente relacionada à higiene da ordenha e à limpeza dos utensílios utilizados para sua coleta e transporte.

Considerando que neste estudo 79,2% das amostras avaliadas apresentaram *E. coli* e que o leite não sofreu nenhum processo de pasteurização

para a fabricação do queijo, cepas patogênicas provenientes de contaminação fecal do animal e/ou do manipulador durante a obtenção do leite e produção do queijo podem disseminar para o consumidor.

**Queijo Minas Frescal** - Observou-se a presença de *E. coli* em 17 (70,8%) das 24 amostras de queijo Minas Frescal coletadas, sendo isoladas 25 cepas (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram apresentados por PEREIRA et al. (1999), na cidade de Belo Horizonte, que observaram 74,3% de contaminação por coliformes fecais em amostras de queijo Minas Frescal. MONGE et al. (1994) estudaram 20 amostras de queijos comercializados em San José, Costa Rica, identificando *E. coli* em 100,0% das amostras e em contagens superiores a 1.100/g.

O elevado percentual de amostras de queijo Minas Frescal apresentando *E. coli* é bastante preocupante, pelo risco potencial de causar enfermidades e ainda pela possibilidade da presença de outros enteropatógenos como a *Salmonella*. Os resultados encontrados demonstram que as condições higiênico-sanitárias do produto testado não são satisfatórias, podendo apresentar risco à saúde dos consumidores visto à sua larga comercialização no estado.

Diante deste quadro, seria recomendada a atuação mais incisiva dos órgãos de fiscalização sanitária, no intuito de aplicar o que é preconizado na produção deste tipo de queijo, como a pasteurização do leite. É uma prática simples, que se corretamente aplicada, permite a diminuição da carga microbiana inicial com conseqüente eliminação de patógenos. Além disso, a implementação das boas práticas de fabricação minimizaria o perigo da provável contaminação humana e ambiental.

**Tipagem por meio de suscetibilidade a antimicrobianos** - A suscetibilidade das 69 cepas de *E. coli* isoladas frente aos antimicrobianos testados está demonstrada na Tabela 2. Quarenta e dois dos isolados (60,9%) foram suscetíveis a todos os antibióticos testados. Destaca-se que entre os manipuladores, os isolados a partir do nariz apresentaram resistência de 33,3% à cefalotina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina. Nenhuma cepa isolada do nariz apresentou resistência à ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina. As cepas isoladas das mãos apresentaram resistência de 12,5% para cefalotina e tetraciclina e não foi observada resistência à ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e sulfametoxazol trimetoprim.

Em relação ao leite cru, maior resistência (18,2%) foi encontrada para tetraciclina, sendo que nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e gentamicina. Quanto ao queijo Minas Frescal, observou-se resistência (4,0%) à ampicilina, sulfametoxazol trimetoprim e tetraciclina e susceptibilidade aos demais antibióticos.

A partir do teste de suscetibilidade para as 69 cepas isoladas, foi possível agrupá-las em 17 diferentes perfis fenotípicos (A – Q), conforme apresentado na Tabela 3. Das cepas isoladas, 42 se apresentaram no perfil A, seis no perfil B, três no perfil C, duas nos perfis D a G, e os demais perfis com uma cepa cada.

No presente estudo foi possível identificar apenas um perfil fenotípico (E) semelhante entre cepas de *E. coli* isoladas, tanto de amostra de queijo (14Q<sup>b</sup>) como de um dos manipuladores (10M<sup>1</sup>). Tal resultado sugere que possa ter ocorrido contaminação do queijo durante a sua manipulação, portanto, apenas neste caso pôde-se estabelecer a origem da *E. coli* para o produto final. Nas demais situações, não foi possível determinar a fonte da bactéria para o queijo,

pois dentro dos mesmos perfis houve a presença de cepas isoladas tanto do manipulador, quanto do leite.

Nas últimas duas décadas, muitos métodos têm sido aplicados para comparar cepas de *E. coli* para identificar os mecanismos de transmissão e fontes de contaminação (ZADOKS et al., 2002). Entre as técnicas fenotípicas, o teste de suscetibilidade a antimicrobianos tem sido especialmente usado devido a seu baixo custo, facilidade de execução, além de contribuir para informar sobre a resistência microbiana (KLUYTMANS et al., 1995; ACCO et al., 2003).

Porém, os métodos de tipagem fenotípica, que detectam características expressas pelos microrganismos, são limitados pela capacidade destes em alterar a expressão de genes. Mutações pontuais podem resultar em regulação anormal ou alteração funcional do gene responsável por um fenótipo determinado. Assim, isolados da mesma espécie e geneticamente indistinguíveis podem apresentar fenótipo variado. Portanto, os testes de resistência a antimicrobianos podem ser úteis como triagem inicial para identificação de cepas de microrganismos em surtos de doenças transmitidas por alimentos, podendo ser complementados com métodos de tipagem genotípica (ARBEIT, 1999; TENOVER et al., 1997). Entretanto, o antibiograma apresenta limitações, como baixa sensibilidade, o que pode levar à determinação de pontos de controle inadequados ou identificação equivocada de fontes de contaminação.

## **CONCLUSÃO**

Considerando os resultados obtidos neste estudo, observou-se que o antibiograma não se mostrou um teste eficiente na determinação da fonte de microrganismos para o produto final, encontrando-se apenas um perfil fenotípico que permitiu estabelecer essa relação de contaminação. Apesar desta

observação, o antibiograma é ainda eficiente em determinar a suscetibilidade das cepas encontradas nestas fontes e produtos como também pode ser utilizado como instrumento na triagem para aplicação de testes mais sensíveis, como os de tipagem genotípica.

\*Este artigo é produto de um projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás – COEP/UFG.

## REFERÊNCIAS

ACCO, M. et al. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v.20, n.5, p.489-493, 2003.

ALMEIDA FILHO, E.S. et al. Perfil Microbiológico do queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal e inspecionado, comercializado no município de Cuiabá, MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.92/93, p.51-56, 2002.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.102/103, p.71-73, 2002.

AMMON, A. Surveillance of enterohaemorrhagic E. coli (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. **Eurosurveillance**, v.2, n.12, p.91-95, 1997.

ARAÚJO, V.S. et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.6, p.1172-1177, 2002.

ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM PRESS, 1999. Cap.7, p.116-137.

BABÁK, V. et al. Interpretation of the results of antimicrobial susceptibility analysis of *E. coli* isolates from bovine milk, meat and associated foodstuffs. **Food Microbiology**, v.22, n.4, p.353-358, 2005.

BADINI, K. B. **Estudo das características físico-químicas, microbiológicas e dos hábitos de consumo do leite cru comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu –SP e São Manuel – SP.** 1993. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

BARROS, P.O.G. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.57-66, 2004.

BEAN, N.H. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988 – 1992. **Journal of Food Protection**, v.60, n.10, p.1265-1286, 1997.

BONFOH, B. et al. Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, v.14, n.7, p.495-500, 2003.

BRENER, D.J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Noel R. Krieg; John G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.Cap.7, p.408-423.

CÂMARA, S.A.V. et al. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.101, p.32-36, 2002.

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

CARDOSO, R.C.V., Avaliação do grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes de pólo petroquímico de Camaçari. Salvador. (Curso de especialização em controle de qualidade de alimentos), Universidade Federal da Bahia. 1999.

CHYE, F.Y. et al. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v.21, n.5, p.535-541, 2004.

COWDEN, J.M. et al. Outbreaks of foodborne infectious intestinal disease in England and Wales: 1992 and 1993. **Communicable Disease Report**, v.5, n.8, p.109-117, 1995.

CURTIS, M.L. et al. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. Caracas, Venezuela, v.50, n.2, p.177-182, 2000.

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

DOYLE, M.P. et al. *E. coli* O157:H7. In: DOYLE, M.P. et al. (Eds.), **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 1997, p.171-191.

FDA - Food & Drug Administration, 2002. Bacteriological Analytical Manual. **Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**. Capturado em 11 ago.2004. Online. Disponível na Internet <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4html>.

FREITAS, A.C. et al. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection**, v.56, n.5, p.62-65, 1993.

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

IBGE – Pesquisa Trimestral do Leite – Resultados Mensais./2003. **Quantidade de leite cru ou refrigerado adquirido – Brasil**.. Capturado em 21 nov. 2005, Online. Disponível na Internet.<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.aso>.

KLUYTMANS, J. et al. Food-initiated outbreak of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno and genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1121-1128, 1995.

KOTTWITZ, L.B.M.; GUIMARÃES, I.M. Avaliação microbiológica de queijos Coloniais produzidos no Estado do Paraná. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.114/115, p.77-80, 2003.

LIRA, W.M. et al. The incidence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.4, p.861-866, 2004.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, 2001.

MIDURA, T. F. & BRYANT, R. G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: **Compendium of methods for the microbiological examination for foods**. Washington: APHA, 2001, p.13-23.

MONGE, R. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in pasteurized ice cream and soft cheese in Costa Rica, 1992. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v.42, n.1/2, p.327 -28, 1994.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

**NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2003.

OLIVEIRA, A.M. et al. Manipuladores de Alimentos: um fator de risco. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.114/115, p.12-19, 2003.

PEREIRA, M.L. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.5, p.427-431, 1999.

REA, M. C. et al. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, London, n.73, p.331 – 336, 1992.

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

SCHOUTEN, J.M. et al. Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v.64, n.1, p.49-61, 2004.

SILVA JR., E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 479p.

SIMONE, E. et al. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. **Journal of Food Protection**., v.60, n.5, p.442-446. 1997.

TENOVER, F.C. et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.18, n.6, p.426-439, 1997.

ZADOKS, R.N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking, equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.11, p.3894-3902, 2002.

**Tabela 1-** Contaminação por *E. coli* e amostras obtidas de nariz e mãos de manipuladores, de leite cru e de queijo Minas Frescal, coletadas em laticínio de Goiás, Brasil, 2004/2005.

Fonte	Número de amostras coletadas	Amostras positivas		Número de cepas isoladas	
		Número	Freqüência (%)		
Manipulador	Nariz	46	03	6,5	03
	Mãos	46	08	17,4	08
Leite cru	24	19	79,2	33	
Queijo	24	17	70,8	25	
TOTAL	140	47	-	69	

**Tabela 2-** Suscetibilidade aos antimicrobianos, das cepas de *E. coli* isoladas de amostras obtidas de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal, coletadas em laticínio de Goiás, Brasil, 2004 / 2005.

Fonte	Suscetibilidade*	Antimicrobianos n° (%)						
		AMP	CEF	CIP	GEN	SUT	TET	
Manipuladores	Nariz (3)	S	3(100)	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)	2 (66,7)	2 (66,7)
		SI	0 (0)	1 (33,3)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		R	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	1 (33,3)
	Mãos (8)	S	8 (100)	6 (75)	7 (87,5)	8 (100)	8 (100)	6 (75)
		SI	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)
		R	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)
Leite cru (33)	S	29 (87,8)	22 (66,7)	32 (97)	33 (100)	32 (97)	23 (69,7)	
	SI	2 (6,1)	7 (21,2)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	4 (12,1)	
	R	2 (6,1)	4 (12,1)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	6 (18,2)	
Queijo (25)	S	24 (96)	22 (88)	24 (96)	24 (96)	24 (96)	23 (92)	
	SI	0 (0)	3 (12)	1 (4)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	
	R	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	

\* S – sensibilidade; SI – sensibilidade intermediária; R - resistência

AMP – ampicilina; CEF – cefalotina; CIP – ciprofloxacina; GEN – gentamicina;  
SUT – sulfametoxazol-trimetoprim, TET – tetraciclina

**Tabela 3-** Perfis de suscetibilidade a antimicrobianos das cepas de *E. coli* isoladas de amostras de nariz e mãos de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal coletadas em laticínio de Goiás, Brasil, 2004 / 2005.

Cepas isoladas	Perfis de suscetibilidade a antimicrobianos*						Perfil Fenotípico
	SUT	CIP	AMP	GEN	TET	CFL	
4M <sup>4</sup> ; 5L <sup>a</sup> ; 5Q; 6L; 7L; 7Q <sup>a</sup> ; 7Q <sup>b</sup> ; 8L; 8M <sup>2</sup> ; 8N <sup>2</sup> ; 9L; 10Q; 11L <sup>c</sup> ; 11Q; 12Q <sup>a</sup> ; 12Q <sup>b</sup> ; 12M <sup>1</sup> ; 12M <sup>4</sup> ; 13M <sup>2</sup> ; 14L; 14Q <sup>a</sup> ; 15L <sup>a</sup> ; 15Q; 16L <sup>b</sup> ; 16L <sup>c</sup> ; 16Q <sup>a</sup> ; 16Q <sup>b</sup> ; 16Q <sup>c</sup> ; 17L <sup>a</sup> ; 17L <sup>b</sup> ; 17Q <sup>a</sup> ; 17Q <sup>b</sup> ; 17Q <sup>c</sup> ; 18L <sup>a</sup> ; 18L <sup>b</sup> ; 18L <sup>c</sup> ; 18Q; 19Q <sup>a</sup> ; 19Q <sup>b</sup> ; 21Q; 24L; 24Q	S	S	S	S	S	S	A
5L <sup>b</sup> ; 9Q; 11L <sup>b</sup> ; 15M <sup>1</sup> ; 16L <sup>a</sup> ; 19L <sup>b</sup>	S	S	S	S	S	I	B
10L <sup>b</sup> ; 13L <sup>b</sup> ; 15L <sup>c</sup>	S	S	S	S	I	S	C
2L; 20N <sup>4</sup>	S	S	S	S	S	R	D
10M <sup>1</sup> ; 14Q <sup>b</sup>	S	I	S	S	S	S	E
11L <sup>a</sup> ; 23L <sup>b</sup>	S	S	S	S	R	I	F
15L <sup>b</sup> ; 23L <sup>a</sup>	S	S	S	S	R	S	G
3Q	R	S	R	S	R	I	H
4L	S	S	I	S	S	R	I
6Q	S	S	S	I	S	S	J
8Q <sup>b</sup>	S	S	S	S	I	I	K
8M <sup>1</sup>	S	S	S	S	I	R	L
10L <sup>a</sup>	S	I	S	S	S	S	M
10N <sup>2</sup>	R	I	S	S	R	I	N
12L	S	S	I	S	R	I	O
13L <sup>a</sup>	R	S	R	S	R	R	P
19L <sup>a</sup>	S	S	R	S	I	R	Q

\* O perfil de suscetibilidade foi baseado na resistência (R), sensibilidade intermediária (I), e sensibilidade (S) a antimicrobianos.

AMP – ampicilina, CEF – cefalotina, CIP – ciprofloxacina, GEN – gentamicina, SUT – sulfametoxazol-trimetoprim, TET – tetraciclina

L – leite      Q – queijo      M – mão <sup>(1, 2, 3, 4)</sup>      N – nariz <sup>(1, 2, 3, 4)</sup>

a, b, c – correspondem a diferentes cepas isoladas de uma mesma amostra de leite cru ou de queijo

ARTIGO 2

Heterogeneidade genética de cepas de *Escherichia coli* Isoladas em um Laticínio do Brasil Central

Este artigo foi elaborado conforme as normas de publicação do  
Brazilian Journal of Microbiology  
(Anexo 3)

**GENETIC HETEROGENEITY OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED  
IN A DAIRY PLANT IN CENTRAL BRAZIL**

**Maria Raquel Hidalgo Campos <sup>1\*</sup>; Maria Cláudia D.P.B. André<sup>2</sup>; Liana J. Borges<sup>2</sup>; André Kipnis<sup>2</sup>; Fabiana C. Pimenta<sup>2</sup>; Álvaro Bisol Serafini<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

## ABSTRACT

This study aimed to establish the source of *Escherichia coli* in soft cheese in a dairy plant of Goiás, Brasil. Strain of *E. coli* isolated from raw milk (n=24), personnel (n=92) and Minas Frescal cheese (n=24) were typed by the *Xba* I digests DNA macrorestriction patterns obtained following pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Strains were compared to access the role of personnel and raw milk in the cheeses contamination. Based on PFGE genotyping, one strain isolated from food handler's hands and five strains isolated from raw milk were identical or closely related to six strains from cheeses suggesting, in this cases, the probable source of *E. coli* contamination in cheeses. No strain isolated from the nose was related to cheeses or milk strains. The results showed high diversity among the strains, since the 66 isolates typed generated 61 different DNA banding profiles, demonstrating a lack of predominance of an endemic clone in the dairy plant. This paper highlights the usefulness of PFGE as an epidemiological tool for determining the source of *E. coli* contamination in the food industry.

**Key words:** *Escherichia coli*, PFGE, Minas Frescal cheese, raw milk, food handlers.

## HETEROGENEIDADE GENÉTICA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS EM UM LACTICÍNIO DO BRASIL CENTRAL

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar genotipicamente, através da macrorrestrrição do DNA pela enzima *Xba* I seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE), isolados de *Escherichia coli* obtidos a partir de amostras de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal produzidos em um laticínio em Goiás, Brasil, visando estabelecer uma possível relação de contaminação entre o manipulador e/ou a matéria-prima e o produto final. Foram coletadas 24 amostras de leite cru e de queijo Minas Frescal, 46 amostras de mãos e 46 de nasofaringe, com suabes esterilizados, dos manipuladores envolvidos na fabricação do queijo, no período entre março/2004 e fevereiro/2005. *E. coli* foi isolada em 11 (12,0%) das 92 amostras dos manipuladores, em 19 (79,2%) das 24 amostras de leite cru e em 17 (70,8%) das 24 amostras de queijo. A partir dos resultados do PFGE obteve-se 61 perfis eletroforéticos diferentes evidenciando alta diversidade genética entre eles e ausência de cepas endêmicas. Comparando os perfis genotípicos dos isolados de leite e queijo observou-se que dois pulsotipos mostraram cepas indistinguíveis e três possivelmente relacionados, sugerindo que a matéria-prima possa ser provável fonte de contaminação do produto final. Quanto à comparação dos perfis obtidos de isolados de mão e queijo foi possível estabelecer somente uma possível relação de contaminação. Este estudo destaca o PFGE como uma ferramenta útil nos estudos epidemiológicos e na determinação de possíveis fontes de contaminação por *E. coli* na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, PFGE, queijo Minas Frescal, leite cru, manipuladores.

## INTRODUCTION

Because of its chemical composition, milk is considered an excellent culture medium and can be easily contaminated by several microorganisms, as a result of different factors such as the handler's hygiene practices, the environment, utensils and other equipment used in the collection and processing (12,14,36).

Many enteropathogenic microorganisms have been found in milk and dairy products and among these products we can include cheese, stored in inadequate temperatures and consumed without any thermal treatment. They are frequently associated to outbreaks of food-transmitted diseases (1,3,31).

Among the different types of cheese made in the country, the kind known as Minas Frescal has received wide acceptance by the public because it is relatively inexpensive (6). It has become part of the daily diet in many States in Brazil (10,11,22,23). This type of cheese is produced from pasteurized cow milk and because of its high humidity content, because it is a product of animal origin and especially because it is handled extensively, it is easily contaminated and a favorable environment for bacterial survival and multiplication (10,19).

The detection of coliform bacteria, especially *E. coli*, in processed foods, is an indication of contamination by fecal matter. It is also evidence of inadequate control of the raw material, the health of the handler involved in the production process and control of the finished product. Whereas this microorganism has serogroups whose pathogenicity is known by their toxigenic and infectious action (10), the fact that they can be isolated in cheese also

suggests that other pathogenic microorganisms are possibly present in this vehicle (26,32).

Epidemiological studies seek to establish the source of microorganisms in food by using bacterial typing techniques, characterizing isolates from possible sources (animals, handler, equipment and others fomites) and comparing them, in terms of genotype, to isolates from food (18). One of the methods used is macrorestriction of DNA followed by PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) (5). This is a highly discriminatory and reproducible technique whose performance is the same or better than other techniques currently available and has been successfully applied for typing a large number of microorganisms (7,8,23). It is also the most effective technique for differentiating *E. coli* isolates (5).

The objective of this study was to isolate *E. coli* from raw cow milk, from the hands and nose of handlers, and from Minas Frescal cheese produced in a dairy product plant in Goiás, Brazil. Another objective was to determine their genetic profiles and investigate the possible relationship among the strains isolated through PFGE, to establish possible sources of contamination for the final product (cheese).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sampling**

A total of 140 samples, 24 from raw milk, 24 from Minas Frescal cheese, 46 from food handlers' anterior nares and 46 from their hands, were analyzed for the presence of *E. coli* in a small dairy plant in Goiás State, Brazil, from March/2004 to February/2005. The industry was visited twice a month. The

dairy plant had four workers handling milk and/or cheese and they were invited to participate. The study protocol was approved by the Ethical Committee from the Federal University of Goiás and the participants gave informed consent. The hands and anterior nares samples were collected during each visit, from the handlers that were working on that day. Worker n° 1 was sampled 16 times (M<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>); n° 2, 17 times (M<sup>2</sup>, N<sup>2</sup>); n° 3 just once (M<sup>3</sup>, N<sup>3</sup>) and n° 4 was sampled 12 times (M<sup>4</sup>, N<sup>4</sup>). The hands and anterior nares were sampled by rubbing a sterile cotton swab around the inside of nostrils and applying an even pressure and rotating the swab without interruption (35). The swabs were immediately placed in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid). The raw milk and cheese were sampled following methodology described by Midura & Bryant (2001) (24). All collected samples were transported in an isothermal box with ice to the Food Control Laboratory of the Goiás Federal University and immediately analyzed.

### **Microbiological procedures**

The samples were submitted to presumptive, confirmed and completed tests for coliforms, fecal coliforms and *E. coli* according to Feng *et al.* (2002) (17). Based on the completed test (IMViC pattern - indol production, MR-VP test, citrate utilization and the gas production from lactose) the suspected colonies were identified as *E. coli* (IMViC patterns of ++-- (biotype 1) or +-+- (biotype 2). When appropriate, more than one morphologically different colony was obtained from the same sample. The isolates were stored at -20°C in trypticase soy broth (Oxoid) with 20.0% glycerol awaiting further analyses.

### **Pulsed-field gel electrophoresis**

The genetic pattern of *E. coli* isolates was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of digested DNA, using a CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the method of Pfaller *et al.* (1992) (27) with modifications. Briefly, a single isolated colony was inoculated in 3 mL of TSB broth (Oxoid) and incubated at 37°C for 18 h. Five hundred microliters of the culture were pelleted at 6000 *g* in a microcentrifuge for 10 min. Each pellet was resuspended in 300  $\mu$ L of TEN buffer (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA pH 7.5, 150 mM NaCl,) and mixed with 340  $\mu$ L of 1.2% SeaKem Gold agarose. This mixture was dispensed into three plug molds and left to solidify. The plugs were transferred to 1.3 mL of EC buffer (1M Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 7.5, 0.2% deoxycholate, 0.5% Sarkosyl, 0.5% Brij 58) with 200  $\mu$ L of lysozyme (10 mg/mL) for 5 h at 37°C. After that, the plugs were rinsed five times with 1.5 mL of CHEF TE 1X buffer (50 mM EDTA pH 7.5, 1M Tris pH 7.5) followed by incubation at 50°C overnight in 1.4 mL of ES buffer (625 mM EDTA pH 9.3, 5.0% sarkosyl) and 100  $\mu$ L of proteinase K (PK) (20 mg/mL). Plugs were rinsed once with 1.5 mL of CHEF TE 1X buffer and then washed four additional times with the same buffer for 1 h each. Approximately 1/3 of each plug was used for DNA digestion. Plugs were rinsed with 200  $\mu$ L of DNS buffer (1M Tris pH 8.0, 1M magnesium chloride). After incubation at room temperature for 1h the plugs were stabilized in 50  $\mu$ L of 1X restriction enzyme buffer (REB) for 1 h at 5°C. REB was removed and 50  $\mu$ L of 1X REB with 20 U of *Xba* I restriction enzyme was added, and the solution incubated for 2 h at 5°C and then for 20 h at 37°C. Digests of DNA were separated for 19 h by PFGE using 1.0% PFGE agarose in 120 mL of 0.5X TBE buffer (10X TBE = 89 mM Tris pH 8.4, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) in the following conditions: 14°C, 6 V/cm,

5-60 pulse times, with a CHEF DR-II. A lambda ladder molecular weight marker (Bio-Rad) was included in each gel. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 mg/L) and then photographed under UV light.

Isolates of *E. coli* were placed in groups of identical or related strains by comparing the banding patterns produced, using a combination of photographic visual inspection and computer analysis (BioNumerics, v. 4.0; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A pulsotype (PT) was defined as a unique electrophoretic banding pattern. Isolates with identical restriction profiles were assigned as the same type and identified with a capital letter. PTs with one to three differences were considered closely related and were assigned as subtypes (ST) indicated with a numeral suffix. Isolates with more than three differences were considered to be different types (34, 36). Furthermore, the comparison between isolates from different gel runs was strengthened by including, in each gel, an isolate whose PFGE pattern had previously been determined. The coefficients of pairwise similarity were calculated using Dice formula, and dendrograms were created using unweighted-pair group method (UPGMA) using arithmetic averages. The cluster cutoff was set at 80% similarity and all clusters were identified by arabic numerals.

## RESULTS AND DISCUSSION

On Table 1 it is possible to observe that from the 47 positive samples 69 *E. coli* isolates were obtained – 11 isolates came from the handlers, 33 from the raw milk and 25 from the Minas Frescal cheese. Among the 92 samples collected from the handlers, *E. coli* was isolated in 11 (12.0%) of them, and

among the 24 samples of raw milk and cheese, it was found in 19 (79.2%) and 17 (70.8%), respectively. These results make it clear that there is a risk of gastroenteritis outbreaks after consuming these products.

De Buyser *et al.* (2001) (16) evaluated 60 outbreaks of milk and dairy-transmitted diseases, in France and in other countries, from 1980 to 1997, and determined that pathogenic *E. coli* was responsible for around 20.0% of the notified episodes and that cheese made from raw milk or non-specified milk type was the most common food involved.

In Brazil, the presence of pathogenic microorganisms has been observed in Minas Frescal cheese, and several studies confirm the presence of fecal coliforms in this product in Belo Horizonte/MG (26), in Cuiabá/MT (22), in Poços de Caldas/MG (3), in Mato Grosso do Sul (10), in Paraná (21), in Rio de Janeiro/RJ (4,6), in the Federal District (11) and in Três Passos/RS (33).

*E. coli* was isolated in 75.0% of the handlers and most frequently in the hands (08), relative to the nose (03). This finding was expected since the latter site is not described as a normal habitat for this microorganism. Curtis *et al.* (2000) (15) found smaller figures. They detected a 21.9% incidence of *E. coli* in the hands of handlers in restaurants in Caracas, Venezuela. Pinto *et al.* (2001) (29) pointed to the presence of fecal coliforms in 35.5% of handlers' hands tested in Belo Horizonte, MG and Monteiro *et al.* (2001) (25) isolated *E. coli* in 55.0% of handlers' hands tested in the State of Ceará. According to Brod *et al.* (2002) (9) the presence of fecal coliforms is evidence of poor hygiene practices, since a high number of these microorganisms is evidence that hands are not properly cleaned and a clear indication of risk of food contamination by fecal particles.

*E. coli* was isolated in 79.2% of the raw milk samples. Smaller figures were obtained by Chye *et al.* (2004 (14)). They isolated this bacterium in 64.0% of the raw milk samples from dairy farms in Malaysia, while a higher incidence was found by Catão & Ceballos (2001) (13) in a dairy plant in Campina Grande, PB. Enteropathogenic microorganisms have been found in milk consumed without thermal treatment. Contamination during milking, as well as inadequate temperatures during storage and transportation can result in high levels of pathogenic bacteria, which can represent a health risk to consumers (1,4,31).

*E. coli* was isolated in 70.8% of the Minas Frescal samples. Similar results were found by Câmara *et al.* (2002) (10) in Mato Grosso do Sul. They isolated this bacterium in 70.0% of their samples. Pereira *et al.* (1999) (26) found fecal coliforms in 90.0% of Minas Frescal samples in Belo Horizonte, MG, Loguercio & Aleixo (2001) (22), in Cuiabá, MT, detected fecal coliforms in 93.3% of the cheese samples analyzed, and in Poços de Caldas, MG, Almeida Filho & Nader Filho (2002) (3) verified the presence of *E. coli* in 30.0% of the Minas Frescal cheese samples. The presence of *E. coli* is clear evidence that the control of raw material, of the manufacturing process and of the final product is inefficient.

Among the 69 strains, three of them (two in milk and one in cheese) could not be typed, even after four repetitions. The genetic analysis of the 66 isolates resulted in 61 different electrophoretic profiles and 09 to 17 different bands, considering a molecular weight of 679.0 to 48.5 kb, which is evidence of the high level of genetic heterogeneity among the strains.

The dendrogram including all the genetic profiles was built on the basis of similarity levels (Fig. 1). A 80.0% cutoff was considered, resulting in 57

clusters, numbered from 1 to 57. The 66 *E. coli* isolates that were typed were grouped in 60 pulsetypes (PTs) and one subtype (ST).

Ten different electrophoretic profiles were obtained from 11 isolates from handlers, indicating the absence of an endemic strain among them. During the collection period it was possible to determine that the workers hosted more than one clone in their hands and nose, except in one occasion, in which M<sup>2</sup> presented the same clone in these sites (PT A) (Fig. 1).

Genetic typing of the 31 isolates of the raw milk samples generated 30 different electrophoresis profiles, indicating the existence of clonal differentiation of this bacterium in this product. Only the PT T grouped two isolates from a single milk sample (171a and 171b) with identical band profiles, therefore, belonging to the same clone. The D pulsetype and the subtype D1 corresponded to two isolates of the same raw milk sample (161a and 161c), which were considered to be strongly related and are probably strains derived from the same clone (Fig. 1).

Picozzi et al (2005) (28), in Italy, used this technique to compare 12 *E. coli* isolated from cow milk and found different electrophoretic profiles, even when they used a 41.0% similarity level. This difference can be explained by the exposure of the milk to several sources of contamination, such as the personnel involved in the milking process, utensils and the farm environment, and the consequent poor hygiene/sanitation control of the milking activity in the many farms that supply this product.

Among the electrophoretic profiles obtained from the cheese it was not possible to detect any similarity, that is, the 24 isolates produced 24 different pulsetypes. Once again it was possible to see clonal heterogeneity in *E. coli*

strains. Radu *et al.* (2002) (30) found 28 different genotypic profiles in 28 isolates of *E. coli* from samples of beef and poultry meat sold in Malaysia, when using PFGE with a 90.0% similarity level. These authors report that this technique was considered more stable and reproducible, relative to others, and it has been shown to be more reliable for genotypic typing in epidemiological investigations, as corroborated by Grif *et al.* (1998) (20) and Akiba *et al.* (2000) (2).

After comparing the electrophoretic profiles obtained and following the criteria established by Tenover *et al.* (1995) (34) the 14qb (cheese) and 10m1 (hand) strains were considered identical. Therefore, it was possible to establish a contamination relationship of the final product by the handler (PT AA) (Fig. 1). This fact demonstrates that the handler represents a risk of bacterial transmission for the final product, especially when one considers that this small-scale dairy plant uses a manual process for producing Minas Frescal cheese.

Two pulsetypes show identical strains between milk and cheese: PT N (15q and 14l) and PT BF (10q and 11lc) (Fig. 1), according to criteria established by Tenover *et al.* (1995). Three cheese isolates were possibly related to three milk isolates, thereby generating six distinct pulsetypes: PT J and PT K (13lb and 18q), PT V and PT W (14qa and 6l) and PT Y and PT Z (15lb and 17qc), (Fig. 1). These results suggest that the raw material is the probable source of contamination of the final product.

According to Radu *et al.* (2002) (30) the genetic diversity observed among the *E. coli* isolated by means of molecular typing techniques contributed to the investigation of potential epidemiological problems caused by this pathogen. Subtyping of isolates helps in contamination studies in the food

industry, because critical points can be recognized and appropriate measures implemented to guarantee product safety.

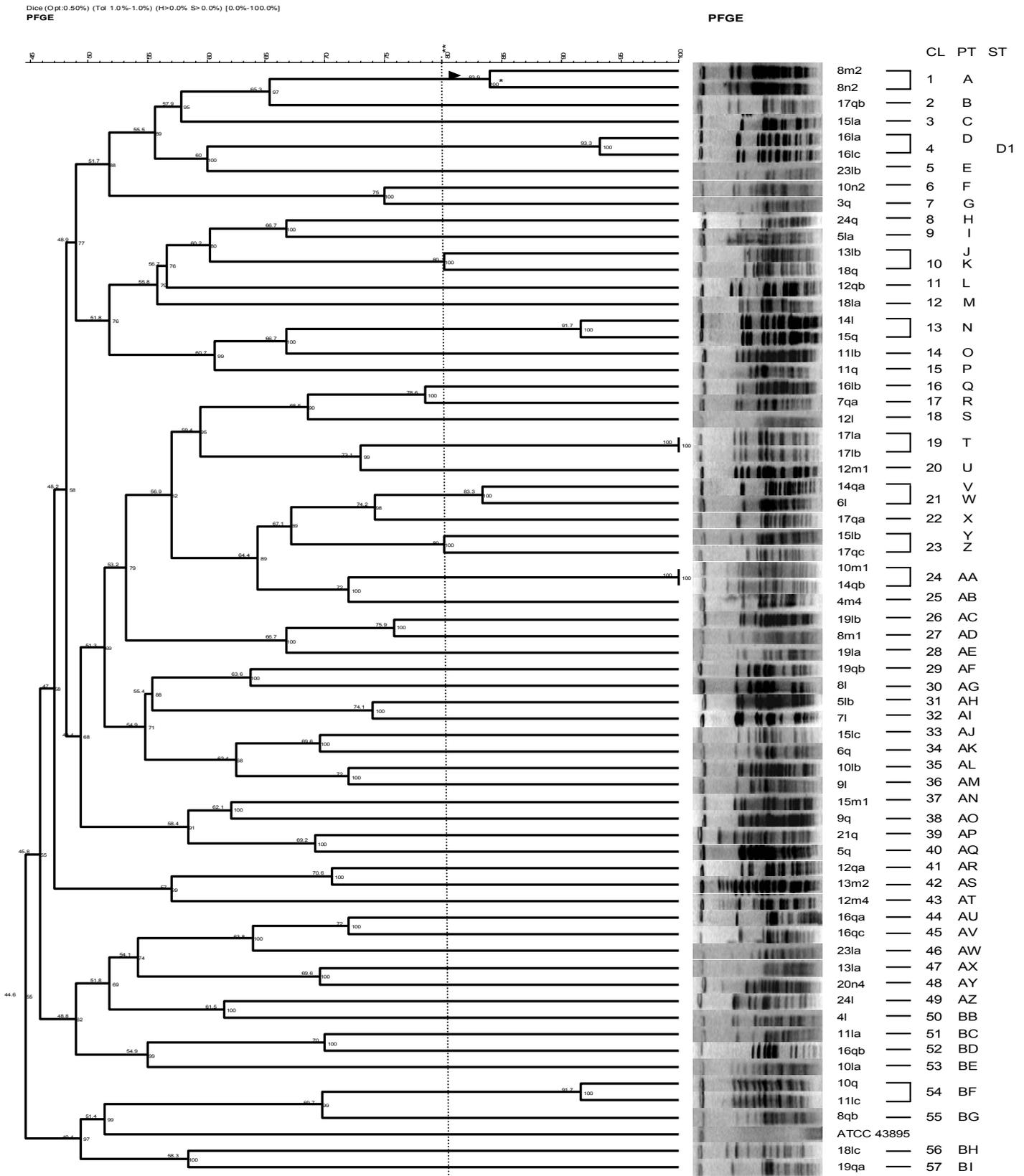
It was possible to see that the use of a highly discriminatory technique, such as PFGE, made it possible to determine the genetic heterogeneity of *E. coli* isolates obtained, thus reflecting the complexity of this microorganism, especially in milk and cheese processing plants.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade for her support in the molecular analysis.

**Table 1.** *E. coli* isolated from dairy staff, raw milk and Minas Frescal cheese in a dairy plant, Goiás, Brazil, 2004/2005.

Source	Samples collected	Positive samples		Number of isolates
		Number	(%)	
Dairy staff nasal	46	03	6,5	03
Dairy staff hands	46	08	17,4	08
Raw milk	24	19	79,2	33
Cheese	24	17	70,8	25
TOTAL	140	47	-	69



**Fig. 1.** Clonal relationships of 66 *E. coli* isolates established with *Xba*I PFGE analysis. Clusters (CL) were labelled with arabic numbers, pulstypes (PT) and subtypes (ST) with capital letters and letters and numbers respectively.  
 → Similarity values, \* Cophenetic correlations, \*\* Cutoff (80%).



9. Brod, F.C.A.; Varaschin, E.B.; Cabral, S.O.; Fiorentini, A. *Avaliação das condições higiênico-sanitárias de lanches comercializados em vias públicas em cidades da Região Fronteira Noroeste/RS*. XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2002, p. 3685.
10. Câmara, S.A.V.; Amaral, G.B.; 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*. *Hig. Alimentar*, 16:32-36, 2002.
11. Cardoso, L.; Araújo, W.M.C. *Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001*. *Hig. Alimentar*, 18:49-53, 2004.
12. Carlos, L.A.; Cordeiro, C.A.M.; Folly, M.M.; Martins, M.L.L. *Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo "C" comercializado no Município de Campos dos Goytacazes, RJ*. *Hig. Alimentar*, 18:57-66, 2004.
13. Catão, R.M.R.; Ceballos, B.S.O. *Listeria spp., Coliformes Totais e Fecais e E. coli no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no estado da Paraíba (Brasil)*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 21:281-28, 2001.
14. Chye, F.Y.; Abdullah, A.; Ayob, M.K. *Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia*. *Food Microbiol.*, 21:535-541, 2004.
15. Curtis, M.L.; Franceschi, O.; Castro, N. *Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos em comedores de empresas privadas*. *Arq. Latinoam. Nutr.*, 50:17-182, 2000.
16. De Buyser, M.L.; Dufour, B.; Maire, M.; Lafarge, V. *Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries*. *Int. J. Food. Microbiol.*, 67:1-17, 2001.
17. Feng, P.; Weagant, S.D.; Grant, M.A. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. In: *Bacteriological Analytical Manual online*. Food & Drug Administration (FDA), 2002. [http:// www.cfsan.fda.gov/](http://www.cfsan.fda.gov/). Access in 19/02/2003.

18. Foxman, B.; Riley, L.W. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am. J. Epidemiol.*, 153:1135-1141, 2001.
19. Gonzalez, A.M.; Rosa, A.C.P.; Andrade, J.R.C.; Tibana, A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Microbiol.*, 17: 321-328, 2000.
20. Grif, K.; Karch, H.; Schneider, C.; Daschner, F.D.; Beutin, L.; Cheasty, T.; Smith, H.; Rowe, B.; Dierich, M.P.; Allerberger, R. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 32:165-176, 1998.
21. Kottowitz, L.B.M.; Guimarães, I.M. Avaliação microbiológica de queijos coloniais produzidos no estado do Paraná. *Hig. Alimentar*, 17:77-80, 2003.
22. Loguercio, A.P.; Aleixo J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, 31: 1063-1067, 2001.
23. Matushek, M.G.; Bonten, M.J.M.; Hayden, M.K. Rapid Preparation of Bacterial DNA for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 34:2598-2600, 1996.
24. Midura, T. F.; Bryant, R. G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: *Compendium of methods for the microbiological examination for foods*, APHA, Washington, 2001, p.13-23.
25. Monteiro, M.C.N.; Timbó, M.O.P.P.; Oliveira, S.C.A.; Costa L.A.T. Controle higiênico-sanitário de manipuladores de alimentos de cozinhas industriais do estado do Ceará. *Hig. Alimentar*, 15: 90-93, 2001.
26. Pereira, M.L.; Gastelois, M.C.A.; Bastos, E.M.A.F.; Caiaffa, W.T.; Faleiro, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 51:427-431, 1999.
27. Pfaller, M.A.; Hollis, R.J.; Sader, H.S. Molecular Biology – PFGE Analysis of Chromosomal Restriction Fragments. In: *Inseberg HD Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM, Washington, 1992, p.10.5.c.1-10.5.c.11.

28. Picozzi, C.; Foschino, R.; Heuvelink, A.; Beumer, R. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 491-496, 2005.
29. Pinto, R.G.; Ornelas, E.A.; Tomich, T.R.; Pereira, A.J.G. *Avaliação da higienização das mãos dos manipuladores em uma indústria de pão de queijo*. XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2001, p. 416.
30. Radu, S.; Ling, O.W.; Rusul, G.; Karim, M.I.A.; Nishibuchi, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J. Microbiol. Meth.*, 46:131-139, 2001.
31. Reibnitz, M.G.R.; Tavares, L.B.B.; Garcia, J.A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulase y DNAsa positivos em queso 'Colonial' comercializado in el município de Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Argent. Microbiol.*, 30:8-12, 1998.
32. Ritter, R.; Santos, D.; Bergmann, G.P. Análise da Qualidade Microbiológica de queijo Colonial, não Pasteurizado, Produzido e Comercializado por Pequenos Produtores, no Rio Grande do Sul. *Hig. Alimentar*, 15:51-55, 2001.
33. Roos, T.B.; Filho, V.B.S.; Timm, C.D.; Oliveira, D.S. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. *Hig. Alimentar*, 19:94-96, 2005.
34. Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33:2233-39, 1995.
35. Vandenberg, M.F.Q.; Yzerman, E.P.F.; Van Belkum, A.; Boelens, H.A.M.; Sijmons, M.; Verbrugh, H.A. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3133-3140, 1999.

36. Zadoks, R.N.; Van Leeuwen, W.B.; Kreft, D.; Fox, L.K.; Barkema, H.W.; Schukken, Y.H.; Van Belkum, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *J. Clin. Microbiol.*, 40:3894-3902.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos e a macrorrestrição de DNA por endonuclease de restrição *Xba* I seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), como métodos de tipificação fenotípica e genotípica, respectivamente, empregados em *E. coli* isolados de leite cru bovino, manipuladores e queijo Minas Frescal em um laticínio de Goiás, permitiram obter resultados que sugerem a possível fonte de contaminação desta bactéria no produto final nesta indústria de alimentos.

Pelos resultados obtidos nos dois artigos apresentados, o antibiograma classificou as cepas em 17 perfis distintos e o PFGE em 61 perfis eletroforéticos diferentes, demonstrando maior poder discriminatório desta última técnica, como já esperado. Destaca-se na Tabela 1 (anexo 4) que o isolado 16L<sup>c</sup> apresentou o perfil fenotípico “A” e o isolado 16L<sup>a</sup> o perfil fenotípico “B”, entretanto, ambos isolados apresentaram identidade clonal no PFGE ou seja o pulsotipo D e o subtipo D1.

O PFGE permitiu identificar alta heterogeneidade genética entre as *E. coli* isoladas, entretanto, observou-se maior correlação entre as isoladas do queijo e do leite (Tabela1, Figuras 1 e 2 - anexo 4) do que entre aquelas isoladas do queijo e dos manipuladores, sugerindo o leite cru como provável fonte deste microrganismo para o queijo Minas Frescal. Como não foi observada correlação de isolados do nariz dos manipuladores com os do queijo, estes não parecem ser fontes importantes da bactéria para o produto final analisado.

A técnica de tipificação genotípica utilizada (RFLP/PFGE) é amplamente empregada em vários países mas, no Brasil, tem se limitado a alguns laboratórios de pesquisa brasileiros. Durante a sua execução, no presente estudo, alguns aspectos importantes foram observados como a dificuldade de padronização (cinco protocolos testados), elevado custo tanto dos equipamentos como do material de consumo, entretanto os resultados obtidos foram eficientes e conclusivos.

Embora fugindo dos objetivos da pesquisa, foi observado que os funcionários (manipuladores de alimentos) albergaram mais de uma cepa diferente de *E. coli* nos dois sítios anatômicos pesquisados (mão e nariz), no decorrer do estudo, ou seja, durante um ano, evidenciando a importância da seleção de cepas desde o início da análise microbiológica, onde a identificação morfológica e bioquímica de mais de uma colônia por placa permitiu a constatação destas distintas cepas coabitando os manipuladores.

Nesse estudo, o manipulador não foi considerado como principal fonte da *E. coli* para o produto final, entretanto, ressalta-se sua importância como potencial disseminador desse patógeno de origem fecal, pelas características artesanais de produção do queijo na indústria investigada. Segundo informações obtidas no local, a mesma não apresenta Manual de Boas Práticas de Fabricação implantado e Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), assim os envolvidos no processo não foram capacitados tecnicamente quanto às práticas adequadas de higiene e saúde pessoal e manipulação de alimentos.

A obtenção do leite cru com razoável qualidade higiênico-sanitária ou com menor carga microbiana inicial, ainda é muito difícil pelas condições

inadequadas das propriedades produtoras deste alimento no estado de Goiás e no país, embora esforços venham sendo implementados neste sentido. Apesar do artigo 200 do Regulamento do Serviço de Inspeção Federal estabelecer que “só é permitida a fabricação de queijos frescos e moles a partir de leite pasteurizado”, tal fato não é observado na maioria das plantas de produção industrial de queijo Minas fescal na região. A indústria avaliada contava com um pasteurizador de placas, mas o leite era aquecido somente até alcançar a temperatura para intensificar a atuação do coalho (em torno de 45°C), não sofrendo o tratamento térmico recomendado para a pasteurização.

Os riscos desta prática podem ser confirmados pelos resultados obtidos neste trabalho onde o leite se apresentou como provável fonte de *E. coli* no queijo e pelo isolamento desta bactéria em 70,8% das amostras de queijo obtidas, caracterizando a possibilidade deste produto causar casos ou surtos de DTAs.

Conclui-se, a partir desta pesquisa, que a associação de tipificação fenotípica e genotípica de microrganismos em alimentos é muito importante em estudos epidemiológicos. Acredita-se que tal investigação, possa contribuir para a construção de orientações técnicas na implantação de programas destinados ao controle higiênico-sanitário na produção de leite e derivados na região, bem como, buscar integração entre órgãos governamentais de vigilância sanitária, instituições de ensino e pesquisa na área nutrição, tecnologia de alimentos e saúde pública, setores da indústria leiteira e comercialização de produtos afins.

Os resultados aqui gerados podem subsidiar novas atividades de pesquisa e extensão desta natureza, inclusive com ações intervencionistas e

preventivas e assim, promover a garantia, no mercado interno, de produtos alimentícios de qualidade sanitária adequada e, conseqüentemente, ampliar a possibilidade de sua comercialização agregando valor ao mesmo.

**ANEXOS**





**BRASILIAN JOURNAL  
OF  
MICROBIOLOGY**  
(Formerly Revista de Microbiologia)

**ISSN 1517-8382 *printed version***

**ISSN 1678-4405 *online version***

## **INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

- [Scope and editorial policy](#)
- [Preparation of originals](#)

### **Scope and editorial policy**

**Brazilian Journal of Microbiology**, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, research notes and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology.

The following categories of papers are acceptable for publication in **Brazilian Journal of Microbiology**:

*Research paper*: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

*Short Communication*: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

*Mini-review*: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

### **Submission of a manuscript**

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

All manuscript should be typewritten in English and submitted in triplicate to the [Editors](#). **A disk or CD with the text should also be included.** Manuscripts submitted by **fax** or **Email** will **not be accepted**.

### **Publication of a manuscript**

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed. Referees are indicated by the Editors. The manuscript will be returned to the nominated author for revision according to suggestions made by the reviewers. The author should return

the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date. The author is notified when a manuscript is received and also when it is accepted or rejected for publication.

On acceptance of a paper, the nominated author will be requested to send the text in a computer disquette. Galley proofs will be sent to the author for correction. They should be checked carefully and handed promptly according to instructions which are attached.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication. Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

**Submission of a manuscript implies that all authors and their institutions have agreed with its publication. Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the author.**

## Preparation of originals

### General

1. *All manuscripts* should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. Manuscripts must be written in English, and include an abstract in Portuguese (*Resumo*). The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission. Manuscripts written in poor English will not be accepted.
2. The paper should be organized in topics, as described in the next paragraph. The name of the topics should be typed in capital letters (e.g. ABSTRACT, INTRODUCTION, etc). Citation of tables and figures should initiate with capital letters (e.g. as shown in Table 1..., as presented in Fig.2..., etc).
3. *Research papers* consists of 12 to 15 double-space typewritten pages **including references, tables and figures**. An abstract (*Resumo*) with title and three to five key-words (*Palavras-chave*) in Portuguese must be provided. The text should be restricted to 15 printed pages, **including references, tables and figures**.
4. *Short Communications* should be restricted to 6 printed pages. It should be written according to the guidelines given for the research papers (see above) but without heading divisions. It's abstract and *resumo* (in Portuguese) should not exceed 50 words. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure. The author should state that the manuscript is a short communication so that it can be properly evaluated during the review process.
5. *Mini-review*: In addition to the Abstract in English and in Portuguese (*Resumo*), they may contain a list of contents.
6. *Abbreviations* of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

**As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. Exceptionally, when authors are**

7. mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.
8. Authors of accepted papers will be requested to send a 3 1/2" disk or CD containing the text prepared in a P.C. based word processor. Authors may also send this material by e-mail.

## Organization

Title page: **A separate page should be used to give the title of the paper, complete name (including)**

first name and middle initials) and affiliation of each author. An asterisk should be placed after the name of the author to whom correspondence about the paper should be sent. The telephone and fax numbers and e-mail address of this author should be given in the bottom of the page. No text of the manuscript should appear on the title page. The title should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper. Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

**Abstract:** The abstract should be typed in a separate page and should not exceed 250 words. It should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper. Three to five key-words should be provided.

**Resumo:** *Resumo* is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. The *resumo* should also contain a title in Portuguese. The rules for the title in Portuguese are the same as for the title in English (see above). Three to five *palavras-chave* (key-words) have also to be included. The *resumo* and the title in Portuguese should also be typed in a separate page.

**Introduction:** The introduction should begin on a new page and provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

**Materials and methods:** This section should provide enough information for other investigators to repeat the work. Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often make this section easier to read and understand.

**Results:** This section should, by means of text, Tables and/or Figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results and Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more

appropriate. Tables should be numbered independently of the figures using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text. The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

**Discussion:** This section should discuss the results in relation to the literature cited.

**References:** Should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers. Journal names should be abbreviated according to *Biological Abstracts* or *Chemical Abstracts*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list. Examples:

a. Journal article

Camello, T.C.F.; Mattos-Guaraldi, A.L.; Formiga, L.C.; Marques, E.A. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 34 (1), 39-44, 2003.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W. (eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, 2003, p.733-743.

c. Book

Salyers, A.A.; Whitt, D.D. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. ASM, Washington, 1994, 418p.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. Manufacture of cottage cheese. *U.S. Pat. 3,117,870*. Jan.14, 1964.

e. Thesis

Dilkin, P. *Intoxicação oral prolongada de suínos por aflatoxina B1 e fumonisinas*. São Paulo, 2003, 130p. (Ph.D. Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Korenblum, E.; Sebastián, G.V.; Rosado, A.S.; Seldin, L. Production of antimicrobial substances by different *Bacillus* strains isolated from oil reservoirs. XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2001, p.35.

g. Publication in the web

De Marco, J.L.; J.L.; Felix, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trychoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochemistry*, <http://www.biomedcentral.com/1472-2091/3/3>, 2002.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

**Acknowledgments:** This section is optional and should be presented in a separate page. It acknowledges financial and personal assistance. This page will not be included in the total number of pages of the manuscript.

**Tables:** Tables should not be included in the text. Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

**Figures:** Arabic numbers should be used to number the figures. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

**Photographs and line drawings:** Should be kept to a minimum strictly necessary for the understanding of the paper. Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on the back and identified with the nominated author's name. Legends of line drawings and photographs should not exceed the printing area. All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn or printed in black and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

Reprints: **Ten reprints of each paper will be mailed to the nominated author, free of charge. Additional reprints may be ordered and will be charged.**

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

---

© 2006 SBM

Departamento de Microbiologia - ICB II - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214  
Cidade Universitária  
05508-900 São Paulo SP - Brasil  
Tel. / Fax: +55 11 3813-9647



[bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)















## ANEXO 4

**Tabela 1** - Classificação de *E. coli* isoladas de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal segundo seus perfis fenotípicos e genotípicos.

Número do isolado e origem*	Perfil de susceptibilidade**	Fenótipo	Genótipo (PFGE)
4M <sup>4</sup> ; 5L <sup>a</sup> ; 5Q; 6L; 7L; 7Q <sup>a</sup> ; 8L; 8M <sup>2</sup> ; 8N <sup>2</sup> ; 9L; 10Q; 11L <sup>c</sup> ; 11Q; 12Q <sup>a</sup> ; 12Q <sup>b</sup> ; 12M1; 12M4; 13M2; 14L; 14Q <sup>a</sup> ; 15L <sup>a</sup> ; 15Q; 16L <sup>b</sup> ; 16L <sup>c</sup> ; 16Q <sup>a</sup> ; 16Q <sup>b</sup> ; 16Q <sup>c</sup> ; 17L <sup>a</sup> ; 17L <sup>b</sup> ; 17Q <sup>a</sup> ; 17Q <sup>b</sup> ; 17Q <sup>c</sup> ; 18L <sup>a</sup> ; 18L <sup>c</sup> ; 18Q; 19Q <sup>a</sup> ; 19Q <sup>b</sup> ; 21Q; 24L; 24Q	SSSSSS	A	AB; I; AQ; W; AI; R; AG; <b>A</b> ; <b>A</b> ; AM; <b>BF</b> ; <b>BF</b> ; P; AR; L; U; AT; AS; <b>N</b> ; V; C; <b>N</b> ; Q; <b>D1</b> ; AU; BD; AV; <b>T</b> ; <b>T</b> ; X; B; Z; M; BH; K; BI; AF; AP; AZ; H
5L <sup>b</sup> ; 9Q; 11L <sup>b</sup> ; 15M <sup>1</sup> ; 16L <sup>a</sup> ; 19L <sup>b</sup>	SSSSSI	B	AH; AO; O; AN; <b>D</b> ; AC
10L <sup>b</sup> ; 13L <sup>b</sup> ; 15L <sup>c</sup>	SSSSIS	C	AL; J; AJ
20N <sup>4</sup>	SSSSSR	D	AY
10M <sup>1</sup> ; 14Q <sup>b</sup>	SISSSS	E	<b>AA</b> ; <b>AA</b>
11L <sup>a</sup> ; 23L <sup>b</sup>	SSSSRI	F	BC; E
15L <sup>b</sup> ; 23L <sup>a</sup>	SSSSRS	G	Y; AW
3Q	RSRSRI	H	G
4L	SSISSR	I	BB
6Q	SSSISS	J	AK
8Q <sup>b</sup>	SSSSII	K	BG
8M <sup>1</sup>	SSSSIR	L	AD
10L <sup>a</sup>	SISSSS	M	BE
10N <sup>2</sup>	RISSRI	N	F
12L	SSISRI	O	S
13L <sup>a</sup>	RSRSRR	P	AX
19L <sup>a</sup>	SSRSIR	Q	AE

\* M – Mão; N – Nariz; L – Leite; Q – Queijo

\*\* Resistência (R), Susceptibilidade intermediária (I) e Susceptibilidade (S).

Seqüência de antibióticos: sulfametoxazol - trimetoprim, ciprofloxacina, ampicilina, gentamicina, tetraciclina, cefalotina

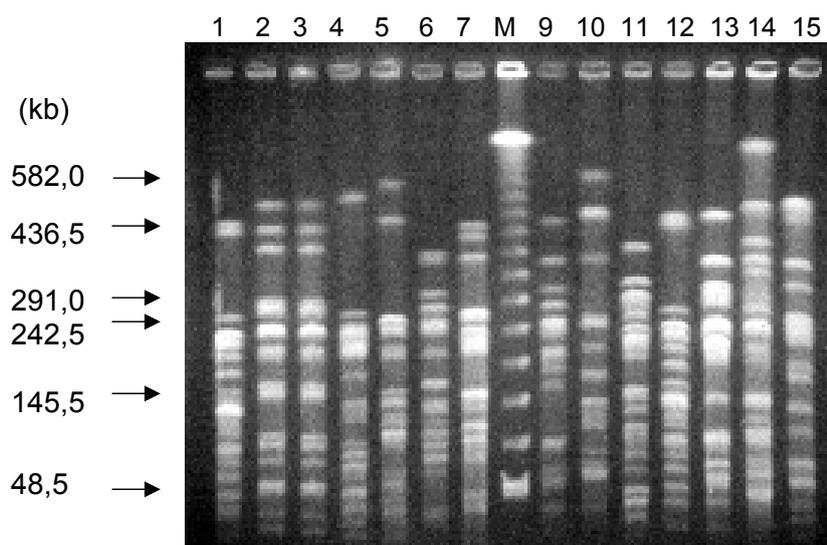


Figura 1 - Perfis eletroforéticos de PFGE de *E. coli* isoladas de leite (linhas 2, 3, 7, 9, 10 e 15) e queijo (linhas 1, 4, 5, 6, 11, 12, 13 e 14). Linha M, marcador (lambda ladder – Bio-Rad)

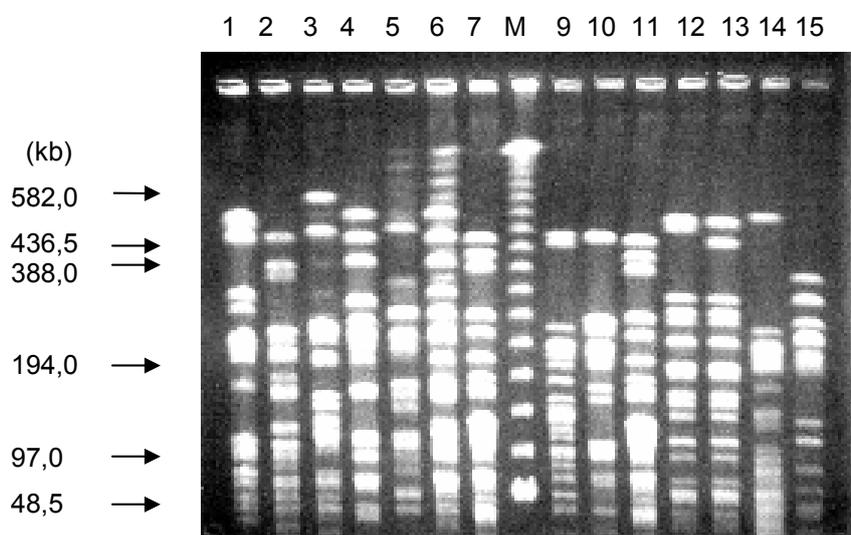


Figura 2 - Perfis eletroforéticos de PFGE de *E. coli* isoladas de leite (linhas 1, 7, 10, 12 e 13), de queijo (linhas 2, 3, 9, 11, 14 e 15) e manipuladores (linhas 4, 5 e 6). Linha M, marcador (lambda ladder – Bio-Rad).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)