

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

**Isolamento de *Escherichia coli* ácido-resistentes em fezes de bovinos
submetidos à dieta de volumoso e concentrado**

Helissa de Oliveira Mendonça Moreira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Perecmanis

BRASÍLIA
Distrito Federal – Brasil
Julho – 2007

HELISSA DE OLIVEIRA MENDONÇA MOREIRA

**Isolamento de *Escherichia coli* ácido-resistentes em fezes de bovinos
submetidos à dieta de volumoso e concentrado**

Dissertação apresentada à Universidade de
Brasília como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Nutrição
Humana.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone Perecmanis

BRASÍLIA
Distrito Federal – Brasil
Julho – 2007

Dissertação defendida e aprovada no Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília – Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof^a.Dr^a. Simone Perecmanis
(Orientadora – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB)

Prof. Dr. Renato Junqueira Borges
(Membro – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB)

Prof^a.Dr^a. Yolanda Silva de Oliveira
(Membro – Departamento de Nutrição – UnB)

Prof^a.Dr^a. Wilma M.C.Araújo
(Membro – Departamento de Nutrição – UnB)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter estado presente em todos os momentos da minha vida;

À minha orientadora, prof^a.dr^a.Simone Perecmanis, pelo apoio, incentivo e pelas sugestões sempre pertinentes, que contribuíram demasiadamente para o aprimoramento deste trabalho;

Aos professores doutores Gumercindo e Diogo, que colaboraram com presteza para a realização deste trabalho;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

Aos meus pais, Marlene e Heleno, pela dedicação com que tiveram comigo desde meus primeiros anos de vida,

Aos meus irmãos, Quênia e Bruno, pelo carinho e compreensão;

Aos meus amigos, que acompanharam de perto ou de longe as minhas alegrias e tristezas;

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Médico Veterinária da UnB, Hudson, Nara e Daniela, por terem me auxiliado na realização do experimento;

Aos servidores da Fazenda Água Limpa, pertencente à Universidade de Brasília (UnB), pelo auxílio na coleta das amostras de fezes dos animais;

Ao meu querido esposo, Rafael, pela fonte inesgotável de amor e inspiração.

Sumário

	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	<i>vi</i>
	LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	<i>vii</i>
	RESUMO.....	<i>viii</i>
	ABSTRACT.....	<i>ix</i>
1.	INTRODUÇÃO.....	<i>10</i>
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	<i>12</i>
2.1.	Classificação taxonômica.....	<i>12</i>
2.2	A Escherichia coli (histórico).....	<i>12</i>
2.3	Habitat.....	<i>12</i>
2.4	Características morfológicas e bioquímicas da Escherichia coli.....	<i>13</i>
2.5	Fatores de Virulência.....	<i>14</i>
2.6	Classificação da Escherichia coli em Patotipos.....	<i>14</i>
2.6.1	E.coli enteropatogênica clássica (EPEC).....	<i>15</i>
2.6.2	E. coli enterotoxigênica (ETEC).....	<i>15</i>
2.6.3	E. coli enteroinvasora (EIEC).....	<i>17</i>
2.6.4	E. coli enterohemorrágica (EHEC).....	<i>18</i>
2.6.5	E. coli enteroagregativa (EAEC).....	<i>19</i>
2.6.6	E. coli difusamente aderente (DAEC).....	<i>20</i>
2.6.7	E.coli uropatogênica (UPEC).....	<i>20</i>
2.7	Descrição das toxinas de Escherichia coli e suas ações.....	<i>21</i>
2.8	Classificação em Sorotipos.....	<i>23</i>
2.9	Importância das colibaciloses em humanos e sua veiculação por alimentos.....	<i>25</i>
2.10	Reservatórios e fontes de contaminação da Escherichia coli	<i>27</i>
2.11	Bovinos como reservatórios de Escherichia coli.....	<i>28</i>
2.12	A importância da dieta de bovinos para a seleção de Escherichia coli ácido – resistentes.....	<i>29</i>
2.13	A importância da existência das Escherichia coli ácido – resistentes no abate dos animais e sua permanência na carcaça.....	<i>33</i>
2.14	Adaptação da Escherichia coli ao ambiente ácido.....	<i>34</i>
3	OBJETIVOS.....	<i>38</i>
3.1	Objetivo Geral.....	<i>38</i>
3.2	Objetivos específicos.....	<i>38</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	<i>39</i>
4.1	Localização do experimento.....	<i>39</i>
4.2	Animais utilizados e dieta utilizada.....	<i>39</i>
4.3	Período das coletas e divisão da amostragem por grupo.....	<i>40</i>
4.4	Coleta das amostras de fezes.....	<i>40</i>
4.5	Cultivo e Identificação bacteriana.....	<i>40</i>
5	RESULTADOS.....	<i>43</i>
6	DISCUSSÃO.....	<i>48</i>
7	CONCLUSÃO.....	<i>51</i>
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<i>52</i>
	ANEXO.....	<i>60</i>

Lista de siglas e abreviaturas

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA	IBGE
INDOL, VERMELHO DE METILA, VOGES-PROSKAUER E CITRATO	IMVic
<i>E.coli</i> enteropatogênica clássica	EPEC
<i>E.coli</i> enterotoxigênica	ETEC
<i>E.coli</i> enteroinvasora	EIEC
<i>E.coli</i> enterohemorrágica	EHEC
<i>E.coli</i> enteroagregativa	EAggEC
<i>E.coli</i> difusamente aderente	DAEC
<i>E.coli</i> uropatogênica	UPEC
Caldo Luria Bertani	Caldo
	LB
Shiga like toxin	Stx

Lista de Tabelas e Figuras

TABELA 1: Relação entre as amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta A e o crescimento de *Escherichia coli* após choque ácido de 1 e de 6 horas. 44

TABELA 2: Relação entre as amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta B e o crescimento de *Escherichia coli* após choque ácido de 1 e de 6 horas. 45

TABELA 3: Relação entre as amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta C e o crescimento de *Escherichia coli* após choque ácido de 1 e de 6 horas. 46

GRÁFICO 1: Crescimento positivo de *Escherichia coli* após 1 h de choque ácido nos três tipos de dieta 47

GRÁFICO 2: Crescimento positivo de *Escherichia coli* após 6 h de choque ácido nos três tipos de dieta 47

Resumo

Embora a *Escherichia coli* seja um organismo comensal que reside dentro do Trato Gastrointestinal dos mamíferos, algumas cepas (por exemplo, O 157: H7) produzem toxinas, sendo, portanto, patogênicas. Os bovinos são reservatórios naturais assintomáticos de *E. coli* O 157: H7. Produtos cárneos de origem bovina têm sido frequentemente associados à infecção por *E. coli*. A resistência à acidez parece ser um fator de patogenicidade na transmissão de *E. coli* de bovinos para humanos. Pesquisadores têm debatido a relação da alimentação bovina com a disseminação de *E. coli* ácido-resistente. Em vários estudos, quando o ruminante mudou abruptamente de uma dieta rica em grãos para uma dieta rica em feno, as populações de *E. coli* reduziram em número, e a habilidade deste microrganismo para sobreviver em choque ácido similar ao estômago gástrico humano também diminuiu. Por outro lado, existem pesquisas em que a ingestão de feno não apresentou efeito ou até mesmo aumentou o número e/ou virulência de *E. coli*. Neste estudo, trinta e nove bovinos foram usados para receberem três tipos de dieta. As amostras fecais dos animais foram coletadas durante 4 meses. As amostras foram cultivadas para a detecção de *E. coli* ácido-resistente. Os bovinos que se alimentavam de capim tiveram menos culturas positivas para *E. coli* ácido-resistente do que aqueles que ingeriram as dietas com concentrado e silagem. Os resultados indicam que a mudança da alimentação do bovino reduz populações de *E. coli* ácido-resistente.

PALAVRAS CHAVE: *Escherichia coli*, acidez, resistência, capim, concentrado

Abstract

Although *Escherichia coli* is commensal organism that reside within the gastrointestinal tract of the mammals, some strains (for example O157:H7) produce toxins and are pathogenic. Cattle are asymptomatic natural reservoirs of *E. coli* O157:H7. These animals have often been implicated in *E. coli* infection. Acid resistance appears to be a factor in the dissemination of *E. coli* from cattle to humans. Researchers have to debate the relationship between the feeding cattle and the dissemination of acid-resistant *E. coli*. In several studies, when cattle were abruptly switched from a high grain diet to a forage diet, *E. coli* populations declined and the ability of this microbe to survive an acid shock similar to the human gastric stomach also decrease. On the other hand, there are researches hat forage feeding had no effect on increased the number and/or virulence of *E. coli*. This study, thirty nine cattle were used in tree diet design experiment. Fecal samples were collected for four months. Samples were cultured for detection of acid- resistant *E.coli*. Cattle fed forage diet had less culture positive for acid- resistant *E.coli* than cattle fed a grain diets. Results indicate that switching cattle from grain to forage reduce populations acid- resistant *E.coli*.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, acid, resistance, forage, grain.

1. Introdução

A toxinfecção causada por cepas de *Escherichia coli* diarreiogênicas é uma das causas mundiais de diarreia aguda em humanos e em animais. Este microorganismo aumenta a mortalidade infantil em países em desenvolvimento e é a principal causa de atendimento médico aos viajantes. Alimentos contaminados de origem animal e vegetal podem ser fontes de transmissão do patógeno. No caso de produtos de origem animal, a *Escherichia coli* O157: H7, uma cepa ácido-resistente produtora de verotoxinas, surgiu nas últimas décadas como causadora não só de toxinfecção, mas também de Síndrome Urêmica Hemolítica em crianças.

A contaminação de carcaça de bovinos com fezes durante o abate (RUSSELL et al, 2000), e a utilização destas carcaças para a elaboração de produtos cárneos consumidos sem ou com tratamento térmico inadequado, foi associada às toxinfecções humanas por *Escherichia coli* (DIEZ-GONZALEZ et al, 1998).

Segundo DIEZ-GONZALEZ et al (1998), a resistência à acidez parece ser um fator de patogenicidade na transmissão de *Escherichia coli* de bovinos para humanos. Isto porque o pH gástrico humano é ácido e somente as culturas de *Escherichia coli* ácido-resistentes seriam capazes de sobreviver a esta condição ambiental.

A relação da alimentação bovina com a disseminação de *Escherichia coli* ácido-resistentes (DIEZ-GONZALEZ et al, 1998; TKALCIC et al, 2000; SCOOT et al, 2000; STANTON & SCHUTZ, 2000; GRAUKE et al, 2003; VAN BAALE et al, 2004) vem sendo considerada. Foi verificado que a ingestão de grão, em oposto a ingestão de feno, favorece ao crescimento de *Escherichia coli* ácido-resistentes em bovinos. Entretanto, HOVDE et al (1999) indicaram que a sensibilidade à acidez do organismo não foi afetada pela dieta e que os bovinos que ingeriram feno hospedaram uma população

de *Escherichia coli* O157: H7 por um período mais longo que os bovinos que ingeriram grãos (VAN BAALE et al, 2004).

Embora o Brasil adote o sistema de produção de bovinos de corte extensivo, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), demonstraram que em 2003 o confinamento teria atingido 8% do rebanho bovino existente no país, ou seja, neste ano 8% dos nossos animais estavam se alimentando basicamente de grãos. Diante deste fato, torna-se importante verificar, por meio de estudos científicos, a relação entre a alimentação do bovino criado em solo brasileiro e presença em sua microbiota de *Escherichia coli* ácido-resistente.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Classificação taxonômica

A classificação do agente conforme GARRITY et al (2004):

Domínio *Bacteria*

Filo *Proteobacteria*

Classe *Betaproteobacteria*,

Ordem *Enterobacteriales*

Família *Enterobacteriaceae*

Gênero *Escherichia*

Espécies: *Escherichia coli*, *Escherichia adecarboxylata*, *Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*.

2.2. A *Escherichia coli* (histórico)

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi descrita pela primeira vez, em 1885, por Theobald Escherich, que encontrou este microrganismo nas defecações de crianças lactentes. A diferenciação em cepas patogênicas e apatogênicas só foi possível após caracterização antigênica iniciada por Kauffmann, em 1943. Posteriormente Kauffmann, Knipschildt e Vahne estabeleceram o esquema antigênico do grupo *E. coli* possibilitando a classificação sorológica (BEER, J. , 1999).

2.3. Habitat

A *E. coli* é um microrganismo bacteriano habitante normal do trato gastrointestinal dos animais, sendo eliminada nas fezes dos mesmos e desta

forma ocasionando a contaminação do ambiente. Por contato com estas fontes ambientais de *E. coli* é que ocorre a colonização do trato intestinal de mamíferos logo após o nascimento. Essa bactéria persiste como membro importante da microbiota normal do intestino por toda a vida do seu hospedeiro. Muitas linhagens de *E. coli* são de baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas em localização extra-intestinal, como glândula mamária e trato urinário (QUINN et al, 2005).

2.4. Características morfológicas e bioquímicas da *Escherichia coli*

A *E. coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou imóvel (FRANCO, 2002).

Possui polissacarídeos capsulares (antígenos K) que protegem a membrana externa da parede do ataque do sistema complemento e impedem a fagocitose. Tem adesinas que mediam a aderência aos alvos celulares no trato gastrintestinal e as células que compõem o nicho para a cepa. A *E. coli* é considerada anaeróbia facultativa, capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, e fontes de carbono como acetato e glicose são usados para o crescimento do microrganismo (HIRSH & ZEE, 2003).

A utilização de citrato e a produção de H₂S não são características típicas de espécies de *E. coli*, mas estudos recentes têm relatado que plasmídios podem conferir um fenótipo citrato-positivo (Cit⁺) em *E. coli* (HARNETT et al, 1996).

Os coliformes fecais são caracterizados por produzir ácido e gás em caldo EC (Caldo para *E. coli* idealizado em 1942 por Perry & Hajna, 1944) em temperaturas compreendidas entre 44°C e 46°C. A utilização das provas bioquímicas denominadas IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges - Proskauer e Citrato) classifica a *E. coli* com base nos seguintes

resultados dos testes : Indol (+ ou -), Vermelho de Metila (+), Voges – Proskauer (-) e citrato (-) (FRANCO, 2002).

2.5. Fatores de Virulência

A maioria das cepas deste microrganismo não causa doença ou até mesmo são benéficas para o intestino, todavia, encontramos algumas cepas oportunistas e cepas de *E. coli* patogênicas que podem ser veiculadas por alimentos contaminados por fezes (CALLAWAY et al, 2003 a). A *E. coli*, como uma bactéria Gram negativa, pode liberar complexos lipopolissacarídeos de suas paredes celulares durante a lise. Estas endotoxinas podem causar febre e morte, caso a *E. coli* migre do intestino para a corrente sanguínea (RUSSELL et al, 2000).

Outros fatores como a presença de sideróforos, cápsula, adesinas, fatores necrosantes citotóxicos (CNF, CNF1, CNF2), hemolisinas alfa e beta e as enterotoxinas Stx I e Stx2 (shiga símile), Sta STb, LT1 e LT2 podem estar presentes nas cepas patogênicas do microrganismo (HIRSH e ZEE, 2003).

2.6. Classificação da *Escherichia coli* em Patotipos

As cepas de *E. coli* que produzem doença em crianças, adultos e animais são divididas nos seguintes patotipos: enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EA_ggEC), difusamente aderente (DAEC) e uropatogênica (UPEC), com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas (FRANCO, 2002).

2.6.1. *E.coli* enteropatogênica clássica (EPEC)

A EPEC foi a primeira categoria de *E.coli* diarreiogênica identificada. Em 1995, foi reconhecida a existência de duas categorias de EPEC denominadas EPEC típica e EPEC atípica. As características comuns às duas categorias são a não produção de toxina Shiga (Stx) e ambas serem capazes de causar uma lesão histopatológica no epitélio do intestino, denominada lesão A/E (*attaching and effacing*). As principais diferenças referem-se aos sorotipos e à presença de plasmídio EAF somente nas EPEC típicas (TRABULSI, 2005).

Depois que atravessam a barreira gástrica, as EPEC aderem à mucosa do intestino delgado e também do grosso, determinando alterações que levam à diarreia. O processo de adesão deve ocorrer em duas fases, a primeira sendo superficial e a segunda, na íntima. Os fatores que medeiam a adesão superficial ainda não foram caracterizados definitivamente e a adesão íntima é certamente mediada pela intimina, que para isto interage com o seu receptor (Tir) na superfície do enterócito (TRABULSI, 2005).

A identificação das colônias é inicialmente feita por alguns testes bioquímicos para caracterizar a espécie *E.coli* e em seguida de testes fenotípicos ou moleculares para identificar EPEC (TRABULSI, 2005). A medida mais eficaz no tratamento da infecção por EPEC é a hidratação precoce que reduz drasticamente a mortalidade (TRABULSI, 2005).

2.6.2. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são patótipos de *E. coli* que produzem enterotoxinas termolábeis (LT-I e LT-II) e termoestáveis (STa e STb) (TRABULSI, 2005).

A colonização do intestino delgado é feita principalmente por cepas enterotoxigênicas de *E. coli* pili-dependentes. Duas enterotoxinas, uma termoestável (TE ou ST) e outra termolábil (TL), são produzidas pelas cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, embora nem todas as culturas produzam ambas as enterotoxinas baseadas em plasmídeos. A ação de uma ou outra pode ser demonstrada em segmentos intestinais atados, certas culturas celulares e camundongos lactentes. Os produtores de enterotoxinas não invadem originariamente, porém sua enterotoxina é absorvida pelas células epiteliais. A TL estimula a adenilciclase, resultando na conversão do ATP em AMPc. O último induz a excreção de Cl⁻ e inibe a absorção de Na⁺, causando grandes perdas de fluidos. As duas enterotoxinas podem ser diferenciadas com base na capacidade e toxicidade, características imunológicas, físicas e químicas (CARTER, 1988).

Além de produzir as enterotoxina LT-I e STa, as ETEC apresentam fímbrias, cuja função é fixá-las à mucosa do intestino delgado. Estas fímbrias, também conhecidas como fatores de colonização, são proteínas imunogênicas. Já foram descritos, até o momento, vinte e um fatores de colonização imunologicamente distintos, em amostras de ETEC de origem humana e animal (TRABULSI, 2005).

O diagnóstico de infecção por ETEC se faz pela pesquisa das enterotoxinas LT-I e STa, nas amostras de *E. coli* isoladas de fezes, no meio MacConkey®. A enterotoxina LT-I pode ser demonstrada em culturas de tecidos e por uma variedade de testes imunológicos como aglutinação de hemácias sensibilizadas pela toxina, precipitação em gel, ELISA e outras. Atualmente, o diagnóstico também pode ser realizado através da pesquisa de genes que codificam as toxinas LT-I e STa por meio de sondas genéticas ou de reação de polimerização em cadeia (PCR) (TRABULSI, 2005).

As infecções causadas por ETEC também dispensam antibioticoterapia na maioria das vezes. Entretanto, quando houver indicação, o antimicrobiano deve ser selecionado pelo antibiograma, uma vez que as ETEC podem apresentar resistência múltipla com relativa frequência (TRABULSI, 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, as ETEC constituem um dos enteropatógenos de maior importância em diarreia. Nos países em desenvolvimento, são responsáveis por aproximadamente 20 % dos casos de diarreia em crianças com menos de cinco anos de idade (TRABULSI, 2005).

2.6.3. *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

As EIEC correspondem a sorotipos bem definidos, caracterizados por seus antígenos O, ausência quase constante de antígeno flagelar, incapacidade de descarboxilar a lisina e presença quase constante de um plasmídeo de aproximadamente 120-140 Megadaltons que transporta os determinantes genéticos responsáveis pela penetração de EIEC na célula epitelial. A capacidade de proliferar no interior das células e provocar doenças é dependente de genes plasmidiais e cromossômicos. As EIEC apresentam a patogenicidade semelhante à *Shigella* e assim a infecção intestinal, causada por estas bactérias, consiste de inflamação e necrose da mucosa do íleo terminal e do cólon. A capacidade invasora de EIEC pode ser demonstrada pelo “teste Sereny” (TRABULSI, 2005).

As infecções por EIEC costumam curar espontaneamente (TRABULSI, 2005).

No Brasil, a primeira amostra de EIEC foi isolada das fezes de um paciente com enterite aguda na década de 1960 em estudos realizados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em diferentes áreas

da cidade de São Paulo, na década de 1980, a presença de EIEC foi pesquisada em crianças com até cinco anos de idade, faveladas e não-faveladas. Esta bactéria foi encontrada em 15,8% e em 2,3 % das crianças faveladas e não-faveladas com diarreia, respectivamente. Porém, estudos realizados fora da cidade de São Paulo mostraram baixa prevalência desta bactéria (TRABULSI, 2005).

2.6.4. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

As EHEC também produzem as citotoxinas Shiga like ou SLT-I (ou VT-I) e SLT-II (ou VT-II) e estão associadas a casos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU). Existem atualmente mais de 50 sorotipos de EHEC, mas a *E. coli* O157: H7 é o protótipo dessa categoria, sendo a mais comum e a mais bem caracterizada. (TRABULSI, 2005).

Em linhagens de tecidos, as EHEC aderem intimamente às células, produzindo o mesmo tipo de lesão A/E observadas em amostras de EPEC. Essa adesão íntima está associada também a intimina, codificada pelo cromossomo celular (TRABULSI, 2005).

A identificação das EHEC é realizada pela dosagem de toxinas em cultura de tecidos (células Vero ou HeLa), sondas genéticas ou PCR, que detectam os genes que as codificam. Particularmente em relação a *E. coli* O157:H7, as amostras devem ser cultivadas em ágar MacConkey contendo D-sorbitol, uma vez que esta bactéria não fermenta este carboidrato (TRABULSI, 2005).

Cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) produzem toxinas homólogas às toxinas da *Shigella dysenteriae* e são, portanto, alternadamente denominadas de *E. coli* produtora de Toxina Shiga (STEC) ou *E. coli* produtora de Verocitotoxina (VTEC) (CALLAWAY et al, 2003 a). A denominação “VTEC” provém da observação de Konawalchuk

(1977), na qual foi constatado que este tipo de *E. coli* poderia produzir uma toxina que tem um efeito citotóxico direto em células Vero (COIA, 1998). A *E. coli* produtora de verocitotoxina (VT), ou VTEC, é uma causa bem reconhecida de doença severa em humanos. A VTEC pode pertencer a muitos sorotipos, sendo a cepa do sorotipo O 157: H7 a mais freqüentemente associadas com colite hemorrágica e Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) (CONEDERA et al, 2004).

2.6.5. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Recebem esta denominação amostras de *E. coli* que formam um padrão agregativo de adesão, quando se associam com células HEp-2 ou HeLa. Este tipo de bactéria causa lesões que se caracterizam por hiperplasia moderada do íleo e do ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e deposição de camadas de bactérias agregadas, empilhadas sobre o epitélio (TRABULSI, 2005).

As EAEC produzem duas toxinas, uma termoestável (EAST-I), que é semelhante à enterotoxina STa de ETEC e provoca aumento dos níveis de GMP cíclico em enterócitos e altera a corrente iônica de células intestinais de coelhos *in vitro*, e outra denominada PET (plasmid-encoded toxin), que é uma serina-protease de 108 KDa e degrada espectrina e consequentemente, induz rompimento do esqueleto da membrana celular, com alterações na rede de actina do citoesqueleto (TRABULSI, 2005).

A identificação de EAEC é realizada pela identificação do padrão de adesão em cultura de células, por sondas genéticas, PCR (Reação de Polimerização em cadeia) ou através do cultivo de EAEC em caldo Mueller-Hilton sob agitação ocorrendo a formação de grumos que são visualizados como uma película na superfície do caldo (TRABULSI, 2005).

A antibioticoterapia é indicada somente para os casos de diarreia persistente causada por EAEC, uma vez que para as diarreias agudas a terapia de reidratação oral é recomendada (TRABULSI, 2005).

Em vários países, inclusive no Brasil, EAEC tem sido fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração igual ou superior a 14 dias. Além disso, alguns estudos revelam que a presença de EAEC nos primeiros dias de um episódio de diarreia é fator preditivo de doença prolongada (TRABULSI, 2005).

2.6.6. *E. coli* difusamente aderente (DAEC)

As cepas de DAEC são definidas pela presença do padrão difusamente aderente no ensaio de aderência em células HEP-2, e causa uma síndrome de diarreia aquosa em adultos e crianças. A patogênese da diarreia causada por DAEC não foi bem elucidada ainda, mas muitas características relacionadas à virulência têm sido identificadas. A maioria das cepas de DAEC expressa uma fímbria de superfície designada F 1845 que pode ser codificada tanto por cromossomo como por plasmídeo (SOUSA, 2006).

2.6.7. *E. coli* uropatogênica (UPEC)

As cepas de *E. coli* uropatogênicas, juntamente com outros isolados de *E. coli* estão envolvidas em várias infecções extra-intestinais. Estas cepas possuem fatores de virulência específicos como os sistemas de aderência, toxinas, sistemas de absorção de ferro que as distingue das cepas comensais (SOUSA, 2006).

2.7. Descrição das toxinas de *Escherichia coli* e suas ações

Toxina termolábil

A enterotoxina LT-I é uma proteína imunogênica, com peso molecular de 100.000 daltons. Sua molécula consiste de 5 subunidades periféricas (subunidades B) e uma central (subunidade A). As subunidades B fixam a toxina à superfície da célula epitelial e altera o metabolismo celular. O receptor da enterotoxina LT-I é o gangliosídeo GM-1. Uma vez produzida pela *E. coli* e fixada ao enterócito pelas subunidades B, a subunidade A penetra na célula, ativando a adenil-ciclase, o que provoca aumento de adenosina monofostato cíclico (AMPC) (TRABULSI, 2005).

O aumento desta substância, no interior da célula, determina bloqueio da absorção de sódio pelas células apicais da mucosa, estimulando ainda a excreção de potássio e carbonato pelas células das criptas. Em consequência dessas alterações no metabolismo hidrossalino da mucosa, ocorrerá aumento da quantidade de líquido na luz intestinal e conseqüentemente diarreia (TRABULSI, 2005).

Toxina termoestável

A enterotoxina STa, ao contrário, da enterotoxina LT-I, é uma pequena molécula, contendo apenas 17-18 aminoácidos, não imunogênica, com peso molecular de, aproximadamente, 5.000 daltons. Trata-se, também, de uma potente toxina, no que diz respeito a sua capacidade de alterar o metabolismo hidrossalino da mucosa intestinal. Sua atividade decorre da sua capacidade de ativar a guanil-ciclase, provocando acúmulo de GMPc nas células da mucosa intestinal (TRABULSI, 2005). O mecanismo de ação da STb parece ser diferente, uma vez que as toxinas

não apresentam a mesma seqüência de aminoácidos, interferindo, aparentemente, nos níveis intracelulares de cálcio (TRABULSI, 2005).

A pesquisa da enterotoxina STa é geralmente feita por inoculação de camundongos recém-nascidos (Teste de Dean) com sobrenadantes das culturas. O diagnóstico também pode ser realizado através da pesquisa dos genes que codificam as toxinas LT-I e STa por meio de sondas genéticas ou de PCR (TRABULSI, 2005).

Toxina shigalike (shiga símile)

Anteriormente chamadas de verotoxinas (VT) devido a sua toxicidade para células Vero (uma linhagem de células de rins de macaco verde africano) passaram a ser chamadas de shiga like toxin (Stx) devido a sua semelhança com as toxinas Shiga produzidas pela *Shigella dysenteriae* tipo I (QUINTANILLA, 2005).

As Stx produzidas pelas EHEC são classificadas em 2 grupos denominados de Stx1 e Stx2. Os genes estruturais para as toxinas Stx1 e Stx2, denominados respectivamente de Stx₁ e Stx₂, apresentam cerca de 58% de homologia na seqüência de nucleotídeos. O grupo Stx1 é relativamente homogêneo, sendo Stx1c a forma que apresenta a maior variação. O grupo Stx2 compreende além de Stx2 diversas outras formas que podem apresentar considerável variação na sua seqüência. Stx1 e Stx2 são sorologicamente distintas, mas possuem ação biológica semelhante (TONI et al, 2004).

A Stx consiste de cinco sub-unidades B idênticas que são responsáveis pela ligação da holotoxina ao glicopeptídeo globotriaosilceramida (Gb3) presente na superfície da célula, e uma sub-unidade A responsável pela ação biológica da toxina que clivará o RNA

ribossomal impedindo a síntese protéica na célula do hospedeiro (QUINTANILLA, 2005).

Esta toxina é produzida pelas bactérias no cólon e chega até o rim pela corrente sanguínea danificando a célula renal e produzindo uma oclusão da microvasculatura através da combinação da toxicidade e indução da produção local de citotocinas e quimiocinas, resultando em uma inflamação renal. Este dano pode conduzir a HUS que é caracterizada por uma anemia hemolítica, trombocitopenia e uma falha renal aguda. A Stx também induz apoptose do enterócito (QUINTANILLA, 2005).

Primeiramente, considerou-se que os bovinos eram refratários aos efeitos tóxicos da Stx devido à ausência de receptores de Gb3. No entanto, foi constatada a presença destes receptores nas células proliferativas da cripta no intestino dos bovinos. A movimentação intracelular nas células primárias intestinais dos bovinos faz com que a Stx se localize nos lisossomos ao invés do retículo endoplasmático, o que poderia explicar essa inativação (NAYLOR et al, 2005).

As Stxs são internalizadas para dentro da célula humana via endocitose, resultando em inibição da síntese protéica e morte celular. O dano às células endoteliais do rim por meio deste processo é provavelmente o primeiro evento etiológico em Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS). Este processo pode afetar outros órgãos incluindo o cérebro, miocárdio e pâncreas, com o conseqüente desenvolvimento de encefalopatia, cardiomiopatia e *diabetes mellitus* (COIA, 1998).

2.8. Classificação em Sorotipos

A habilidade para distinguir cepas de *E. coli* sorologicamente é importante em esclarecer as pesquisas, mostrando que certos tipos de *E. coli* causam diarreia de verão ou diarreia infantil. A sorologia é baseada

em diferentes antígenos encontrados em estrutura da superfície bacteriana. Os três antígenos fundamentais são O, K e H. Os antígenos somáticos “O” termoestáveis, relacionados com polissacarídeos da membrana externa, antígenos flagelares “H” termolábeis, relacionados com proteínas dos flagelos, e antígenos capsulares “K” termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares (FRANCO, 2002).

Mais de quatrocentos diferentes sorotipos O: H de EHEC têm sido isolados de bovinos. O estudo de cepas de EHEC é de suma importância devido ao seu envolvimento direto na causa de doenças gastrintestinais humanas, todavia, a diversidade de não-EHEC, a *E. coli* comensal que reside dentro da microbiota intestinal bovina, deve ser também considerada, visto que estes microrganismos podem potencialmente adquirir genes de virulência por mecanismos de conjugação ou via transdução. Nesta última, os “bacteriófagos”, vírus que especificamente infectam bactérias, podem primeiramente infectar uma cepa EHEC e posteriormente transferir genes desta cepa para outra cepa não-EHEC, fazendo com que uma *E. coli* comensal seja convertida em cepas de EHEC com diferentes sorotipos O: H e características fenotípicas (BETTELHEIM et al, 2005).

As cepas de EHEC são uma causa mundial de diarreia aguda tanto em humanos quanto em animais, responsável por uma alta taxa de mortalidade infantil em países em desenvolvimento. Elas são também um importante agente de diarreia entre viajantes de países desenvolvidos que visitam áreas tropicais ou subtropicais no mundo (GUTH, 2000).

A presença de cepas verotoxigênicas (EHEC/STEC) em bezerros saudáveis e com diarreia na Argentina foi descrita por PARMA et al, (2000), que relatou a presença das cepas O5, O8, O20, O22, O26, O39, O91, O103, O113, O116, O117, O141, O171, OX3. No Brasil foram identificados os sorotipos O 114, O119, O125, O55, O126, O128, O114, O26,

055, 086 e O127 com presença de genes de enterotoxinas (RIGOBELLO et al, 2006). No Centro Oeste, em Mato Grosso, amostras de fezes coletadas de bezerros diarréicos apresentaram isolamento de cepas produtoras de toxina Shiga símile do tipo 1 e 2, Fatores Citotóxicos Necrosantes tipo 1 e 2 , e de STa e LT-II (GUTH, 2000). Já no Sudeste, precisamente no Estado de São Paulo, foram coletadas amostras fecais de crianças com diarréia aguda, as quais apresentaram isolamento de cepas pertencentes ao sorotipo O 111 ac: NM, que eram produtoras de toxina Shiga símile do tipo 1 (GUTH, 2002).

Na Bahia, em Salvador, FRANZOLIN et al (2005) isolaram cepas de EPEC, ETEC, EIEC, EHEC e EA_ggEC em amostras fecais coletadas de crianças com diarréia aguda. Em São Paulo, na cidade de Jaboticabal, foram detectadas cepas de *E.coli* pertencentes aos sorogrupos O 157, O 111 e O 113 em amostras fecais extraídas de bovinos com ou sem diarréia. Em amostras de água da cocheira dos animais foram isoladas cepas de *E.coli* dos sorogrupos O 157 e O 111. Já em amostras de leite, nenhuma cepa destes sorogrupos foi identificada (VICENTE et al, 2005). Em 60 propriedades de bovinos de leite localizadas na região de Pelotas, no Rio Grande do Sul, foram isoladas cepas de *E.coli* dos sorogrupos O 157, O 91 e O 112 em amostras fecais dos animais (SANDRINI et al, 2007).

2.9. Importância das colibaciloses em humanos e sua veiculação por alimentos

As doenças veiculadas por alimentos são freqüentes por todo o mundo. Como enfermidades não ocorrem somente em países em desenvolvimento; elas também são comuns depois do consumo de alimentos em áreas industrializadas com níveis avançados de abate, produção e empacotamento (NOWAK et al 2006).

As toxinfecções alimentares custam à economia norte-americana aproximadamente sete bilhões de dólares e resultam em 1.600 mortes por ano. Os agentes de doença veiculada por alimento mais importantes economicamente nos Estados Unidos da América (EUA) são: *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* enterohemorrágica (incluindo O 157: H 7), e *Listeria* (CALLAWAY et al, 2003 b).

Cepas de *E. coli* O 157 apresentando flagelo do sorotipo H7 (O 157: H 7) ou não apresentando flagelo (O 157: H ⁻), que foram posteriormente abreviadas como O 157: H 7/ H ⁻, são importantes patógenos veiculados por alimentos (VUDDHAKUL et al, 2000).

A *E. coli* O 157: H 7 é o sorotipo dominante associado com infecção humana por todo o mundo, e além do sorotipo O 157: H 7/ H ⁻ citado acima, existem outros sorotipos envolvidos com doenças, tais como: O 26: H 11/ H ⁻, O 5: H ⁻, O 91: H 21/ H ⁻, O 103: H 2, O 111: H ⁻, O 113: H 21, O 118: H 16 e O 145: H ⁻ (KIJIMA-TANAKA et al, 2005).

No continente europeu, a freqüência relativa de infecções por VTEC O157: H 7 e não - O 157: H7 em pacientes com Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) e diarreia tem sido estimada pela união dos resultados de vários estudos. Um total de 80 % de VTEC isolados de pacientes com diarreia pertencia aos sorogrupos não - O 157 como: O 26, O 91, O 103, O 111, O 113, O 128, O 145. Em contraste, a freqüência dos sorogrupos O 157 foi estimada em 81 % entre as cepas isoladas de pacientes europeus com HUS (PARMA et al, 2000).

A maioria das doenças veiculadas por alimento somente causam um breve período de desconforto, mas algumas toxinfecções alimentares podem ocasionar graves problemas médicos. A *E. coli* O 157: H 7 causa aproximadamente 40.000 infecções por ano, o período de recuperação é às vezes muito longo, os pacientes podem desenvolver Insuficiência Renal

Crônica, e aproximadamente 250 pessoas morrem a cada ano nos EUA devido a esta toxinfecção alimentar (RUSSELL et al, 2000).

A toxinfecção associada à *E. coli* O 157: H 7 não constitui um problema somente na América do Norte, mas também na América do Sul, Europa, África do Sul, Japão e Austrália (BENENSON, 1997).

O FDA (Food and Drug Administration) estima que 2 a 3% dos casos de toxinfecções alimentares levam à quadros clínicos secundários, sendo a *E. coli* O 157: H 7 associada à Síndrome Urêmica Hemolítica em crianças (SILVA Jr., 1999).

Embora a *E. coli* O 157: H 7 seja o principal agente causador de Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) devido à surtos de VTEC, mais de cem sorotipos têm sido associados com casos esporádicos de doença humana, sendo a maioria deles isolados de ruminantes (BOUKHORS et al, 2002).

2.10. Reservatórios e fontes de contaminação da *Escherichia coli*

Atualmente, é bem estabelecido que o principal reservatório da *E. coli* produtora de verotoxinas no meio ambiente é o bovino, todavia, outros animais de fazenda têm sido apresentados como hospedeiros deste patógeno, incluindo carneiros, caprinos e suínos (KIJIMA-TANAKA et al, 2005) e as aves domésticas (NOWAK et al, 2006).

A carne bovina e os produtos lácteos são as principais origens das infecções humanas causadas por *E. coli* O 157: H 7 (VUDDHAKUL et al, 2000).

Outros alimentos podem estar associados aos surtos de *E. coli*, como as hortaliças, os sucos de fruta e a água utilizada para o consumo humano, que foram contaminados por este microrganismo. A transmissão de um ser

humano para outro é também possível, e este tipo de transmissão explica casos relacionados com piscinas (RUSSELL et al, 2000).

2.11. Bovinos como reservatórios de *Escherichia coli*

Desde o surgimento da *E. coli* enterohemorrágica como importante patógeno humano, a contaminação de alimentos direta ou indiretamente por material fecal de origem animal tem sido a principal fonte deste microrganismo (BETTEHEIM et al, 2004).

Produtos cárneos de origem bovina têm sido associados à infecção por *E.coli* visto que os bovinos constituem um reservatório natural para cepas patogênicas (DIEZ-GONZALEZ et al, 1998).

A idéia que o bovino seja um reservatório para este microrganismo é sustentada pela observação que as carcaças podem ser contaminadas com fezes durante o abate (RUSSELL et al, 2000).

Embora as cepas de *E. coli* compreendam uma vasta proporção da população microbiana intestinal do bovino (acima de 1 %), as contagens de *E. coli* são altamente variáveis e são ainda as de maior número pela estrita população bacteriana anaeróbica (CALLAWAY et al, 2003 a).

As cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) são muito raramente as cepas predominantes de *E. coli* encontradas no rúmen ou intestino do bovino. Apesar de outras cepas de EHEC responsáveis por doenças humanas já terem sido isoladas de bovinos, a maioria dos estudos com estes animais tem medido primeiramente a *E. coli* O 157: H 7. Em razão disto, ACHESON (2000), enfatizou que estudos deveriam examinar a prevalência de todas as EHEC e não somente alguns sorogrupos. (CALLAWAY et al, 2003 a).

Segundo DIEZ-GONZALEZ et al (1998), a resistência à acidez parece ser um fator de patogenicidade na transmissão de *E.coli* de bovinos

para humanos. Isto porque o pH gástrico humano é ácido e somente as culturas de *E.coli* ácido-resistentes seriam capazes de sobreviver a esta condição ambiental.

A prevalência de *E.coli* O 157: H7 em bovinos é altamente dependente da idade do animal e da estação do ano. Bezerros apresentam um maior número de células de *E.coli* O 157: H7 e por um período de tempo mais longo que animais adultos. A população de *E.coli* O 157: H7 também varia ao longo do ano; mais de 80% da população bovina pode ser infectada durante os meses de verão, mas menos de 10 % pode ser contaminada durante o inverno (CALLAWAY et al, 2002 c).

Não é fácil diagnosticar a presença de bactérias patogênicas em bovinos, porque estes patógenos exercem pouco ou nenhum efeito na saúde do animal. No caso da *E.coli* O 157: H7 descobriu-se que o ruminante é insensível aos efeitos deletérios das toxinas produzidas por esta bactéria (PRUIMBOOM-BREES et al, 2000).

2.12. A importância da dieta de bovinos para a seleção de *Escherichia coli* ácido - resistentes

Atualmente, muitos estudiosos têm debatido a relação da alimentação bovina com a disseminação de *E.coli* ácido-resistentes (DIEZ-GONZALEZ et al, 1998; TKALCIC et al, 2000; SCOOT et al, 2000; STANTON & SCHUTZ, 2000; GRAUKE et al, 2003; VAN BAALE et al, 2004).

Estudos epidemiológicos indicaram que a porcentagem de bovinos positivos para *E.coli* O 157: H7 variava de 0 à 3 %, e correlações entre dieta do animal e incidência de *E.coli* O 157: H7 era em muitos casos fraca e inconsistente. Contudo, pelo menos três estudos mostram que a

manipulação dietética exerce um papel fundamental na determinação das propriedades de *E.coli* nestes animais (RUSSELL et al, 2000).

CORNICK et al (2002) afirmaram que o bovino é o maior reservatório de *E.coli* O 157: H7, sendo estimado que, nos Estados Unidos, a prevalência deste microrganismo varie de 2 à 28%.

Os ruminantes não produzem enzimas que degradam os materiais fibrosos presentes nas plantas, todavia, estes animais abrigam bactérias, fungos e protozoários, que são capazes de exercer esta atividade. O bovino proporciona aos microrganismos um habitat adequado para crescimento, e estes fornecem proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos de cadeia curta para o animal (RUSSELL & RYCHLIK, 2001).

Os microrganismos presentes no rúmen podem também fermentar açúcares e amido (RUSSELL & RYCHLIK, 2001). O amido dietético é frequentemente envolvido por uma proteína matriz, que protege o amido da degradação microbiana no rúmen e permite que o amido alcance o intestino (HUNTINGTON, 1997). Os ruminantes possuem amilase pancreática, porém com baixa atividade, por isto, algum amido dietético que escapa da degradação no rúmen, passa através do intestino delgado para o ceco e cólon, onde ele é submetido a uma fermentação microbiana secundária (HUNTINGTON, 1997).

A fermentação do amido no cólon e ceco pela bactéria (incluindo a *E.coli* O 157: H7) produz ácidos voláteis provenientes da fermentação (VFA), que podem reduzir o pH da digesta colônica e inibir a *E.coli*. Entretanto, a despeito dessas condições severas, a *E.coli* multiplica no trato intestinal de bovinos que ingerem rações ricas em grãos (TKALCIC et al ,2000; SCOOT et al, 2000; STANTON & SCHUTZ, 2000).

Rações ricas em grãos estão sendo utilizadas com o intuito de maximizar a eficiência da engorda do gado de corte, pois este tipo de alimento é mais calórico que o feno (HUNTINGTON, 1997). Apesar destas

rações promoverem um maior ganho de peso no animal, estudos têm indicado que a mudança na ingestão de uma dieta rica em feno para uma dieta rica em grãos pode exercer um efeito marcante na população de *E.coli* em bovinos (CALLAWAY et al, 2003 c).

Segundo DIEZ-GONZALEZ et al (1998), o gado que ingere principalmente grãos tem o pH do cólon mais baixo e mais *E.coli* ácido-resistente do que o gado que se alimenta somente de feno.

Em um experimento realizado por JORDAN & MCEWEN (1998), bovinos que recebiam uma dieta altamente concentrada (rica em grãos), passaram a receber uma dieta contendo 50% de milho e 50% de feno de alfalfa, e com esta mudança, as contagens de *E.coli* reduziram 0,3 log em 4 dias.

KEEN et al (1999) dividiram gados naturalmente infectados com *E.coli* O 157: H7 em 2 grupos; um permaneceu ingerindo basicamente grãos e o outro mudou drasticamente a dieta, passando a ingerir somente feno. No 1º grupo, 52% da população inicial desta bactéria sobreviveram e já no 2º grupo, restaram somente 18%.

A partir dos seus estudos, STANTON & SCHUTZ (2000) relataram que a ingestão de uma dieta rica em feno não afetou significativamente a qualidade das carcaças ou causou cortes escuros, todavia, as contagens de *E.coli* não foram reduzidas tão extremamente como foi relatado por DIEZ-GONZALEZ et al (1998).

Experimentos usando a técnica de choque ácido indicaram que a *E.coli* O157: H7 incubada em fluído ruminal extraído de bovinos alimentados com uma dieta rica em grãos foi mais resistente à acidez que a *E.coli* O 157: H7 incubada em fluído ruminal extraído de bovinos alimentados com uma dieta rica em feno (TKALCIC et al, 2000).

Os resultados apresentados por BOUKHORS et al (2002) sustentam a hipótese que a ingestão de uma dieta rica em grãos pode induzir

mecanismos de ácido-resistência em *E.coli* enterohemorrágica no rúmen, permitindo a sobrevivência deste microrganismo no abomaso.

Em seus estudos, CALLAWAY et al (2003 a) não somente concordaram com os achados de DIEZ-GONZALEZ (1998), mas afirmaram que a *E.coli* O 157: H7 tem o mesmo comportamento.

Baseando-se em vários trabalhos, GREGORY et al (2000) fizeram a seguinte declaração: “O caminho mais eficiente para manipular a contagem de *E.coli* no trato gastrintestinal de bovinos consiste na ingestão de feno pelos mesmos”.

Em oposição a todos esses estudiosos, GRAUKE et al (2003) e HOVDE et al (1999) afirmaram que a resistência à acidez da *E.coli* O 157: H7 presente na digesta bovina independe da dieta do animal. Entretanto, GRAUKE et al (2003) concordaram que a *E.coli*, de uma forma genérica, encontrada em bovinos que se alimentam de feno é mais sensível ao choque ácido que aquela presente em gado que se alimentam de grãos.

VAN BAALE et al (2004) constataram em suas pesquisas que bovinos, cujas dietas eram ricas em feno, foram positivos para culturas de *E.coli* O 157: H7 por um período mais prolongado e apresentaram um maior número de células deste microrganismo que bovinos, cujas dietas eram ricas em grãos.

GRAUKE et al (2003) declararam que a ingestão de feno pelo gado no período anterior ao seu abate é ineficiente para reduzir o número e/ou virulência de *E.coli* O 157: H7 no seu trato gastrointestinal.

Já CALLAWAY et al (2003 a), afirmaram que, quando o gado muda drasticamente sua dieta, passando a ingerir somente feno, a população de *E.coli* nas fezes e a população de *E.coli* ácido-resistente declina significativamente em 5 dias. Concordando com esta afirmação, DIEZ-GONZALEZ et al (1998) declararam que o gado poderia ingerir feno por

um breve período de tempo anterior ao seu abate com o objetivo de reduzir bruscamente o risco de infecção alimentar por *E.coli*.

Estudos que vêm associando a ingestão de feno (alfafa no experimento de VAN BAALE et al, 2004; 50% de alfafa e 50 % de gramínea no experimento de GRAUKE et al, 2003) com o aumento ou ausência de efeito na concentração e/ou duração da população microbiana nas fezes, realizaram pesquisas com bovinos inoculados com uma ou mais cepas de *E.coli* O 157: H7 resistente à antibiótico. Obviamente, a vantagem é que cada um desses trabalhos permite quantificar a população deste microrganismo. Mas a limitação é que a conclusão é baseada no comportamento de cepas adaptadas ao laboratório. Por outro lado, estudos que têm relacionado a ingestão de feno com a redução da população fecal de *E.coli* O 157: H7, envolvem animais que estão naturalmente infectados e são baseados em *E.coli* genéricas. Embora animais naturalmente infectados sejam preferidos, isto requer uma amostragem com uma grande quantidade de animais para obter poder estatístico suficiente para observar os efeitos do tratamento, e o mais importante é que os resultados são qualitativos e não quantitativos (VAN BAALE et al, 2004).

2.13. A importância da existência das *Escherichia coli* ácido – resistentes no abate dos animais e sua permanência na carcaça

Os contaminantes das carcaças provêm, particularmente, do couro e do trato gastrintestinal. O controle higiênico-sanitário nas operações de abate é realizado para reduzir a transferência desta contaminação para a superfície das carcaças, incluindo cuidados com as mãos, facas, serras, equipamentos e panos (JARDIM et al, 2006).

As condições higiênico-sanitárias nas operações de abate devem, preferencialmente, ser identificadas com referência ao número de um

organismo indicativo de contaminação fecal, como a *E. coli* (JARDIM et al, 2006). A multiplicação deste microrganismo na carcaça é facilitada se o mesmo for ácido-resistente, visto que a *E. coli* tem o pH ótimo de crescimento em torno de 6 a 8 e imediatamente após o abate, o músculo dos bovinos apresenta pH em torno de 7,4, sendo que o glicogênio de reserva é transformado em ácido lático, abaixando - se o pH para cerca de 5,6 (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.14. Adaptação da *Escherichia coli* ao ambiente ácido

O alimento consumido por animais monogástricos é primeiramente depositado no estômago, onde está sujeito à ação do HCl e pepsina. O pH do estômago químico humano pode ser maior que 6.0 se uma grande refeição tiver sido ingerida, mas, em média, o pH do estômago é tipicamente 2.0 (RUSSELL et al, 2000).

O estômago químico é um ambiente hostil para a bactéria (BENJAMIN & DATTA, 1995), e supõe-se que a acidez gástrica seja a primeira linha de defesa contra patógenos veiculados por alimentos (RUSSELL et al, 2000).

Segundo CALLAWAY et al (2003 c), o estômago químico serve como uma barreira para a colonização intestinal pelas bactérias patogênicas devido ao seu pH baixo e atividade enzimática. Entretanto, algumas bactérias são capazes de sobreviver à passagem gástrica. Bactérias que são mais resistentes ao ambiente gástrico têm uma maior oportunidade de sobreviver e posteriormente, colonizar o trato intestinal e causar doenças.

Embora a tolerância à acidez inata da enterobactéria varie de isolado para isolado, é o aspecto da tolerância à acidez induzida que criticamente determina a sobrevivência em baixo pH. Várias respostas de tolerância à acidez induzida têm sido estabelecidas em *E. coli* e esta regulação precisa

ser ativamente estudada. Primeiro, a resposta de tolerância à acidez (ou habituação ácida) aparece rapidamente na transferência de organismos na fase-log para valores de pH externo moderadamente ácido, por exemplo: 4.0 – 6.0. Segundo, os organismos crescidos para a fase-estacionária tornam-se ácido-tolerantes e uma faixa de respostas na fase-estacionária ocorre principalmente em pH ácido. Terceiro, os íons de Cobre aumentam a tolerância à acidez quando são adicionados ao meio em baixo pH. Quarto, os organismos na fase-log em pH neutro apresentam indução de respostas de tolerância à acidez se transferidos para altas temperaturas ou em adição de vários metabólitos (ROWBURY & GOODSON, 1998).

ROWBURY & GOODSON (1998) sugeriram que uma proteína (ou proteínas) acumulada pela *E. coli* em meio de crescimento ácido (pH igual a 5.0) pode exercer uma papel ativo na indução de tolerância à acidez.

ROWBURY et al (1998) complementam que todo aspecto da tolerância à acidez é afetado por componentes extra-celulares e que estes não são somente formados depois no local das respostas induzidas, mas parecem essenciais para as respostas estabelecidas, por exemplo, a tolerância induzida em pH 5.0 ou em pH neutro mais glicose, glutamato ou aspartato parece ser pelo menos parcialmente dependente de proteínas extra-celulares, enquanto que a protease reduz a extensão de cada uma destas respostas.

Em estudos posteriores, o conteúdo de Ácido-Graxo Ciclopropano (CFA) na membrana celular foi mencionado como o principal fator na resistência à acidez da *E. coli*. O CFA é o principal componente dos fosfolipídeos de muitas espécies de bactéria e recentemente, tem sido estabelecida uma forte correlação entre a resistência de várias cepas de *Escherichia coli* do tipo-selvagem para uma rápida e drástica redução do pH e o nível de CFA presente nos fosfolipídeos da membrana celular destas cepas (CHANG & CRONAN Jr., 1999).

A síntese de CFA depende em parte do fator sigma RpoS. Em *E. coli*, o fator sigma RpoS é criado em muitas situações de estresse, sendo que o acetato (um dos produtos derivados da fermentação de carboidratos) induz RpoS. A importância do RpoS na resistência à acidez da *E. coli* foi fortalecida pela observação que as cepas mutantes de *E. coli* defeituosas em RpoS foram mais sensíveis ao choque ácido agudo que as cepas do tipo-selvagem (RUSSELL et al, 2000).

CANET et al (2003) demonstraram que a adaptação ácida foi perdida em células na fase-log de cepas de *E. coli* desprovidas de algum dos fosfolipídeos.

O papel dos fosfolipídeos pode ser o de fornecer um ambiente de membrana adequado para a adaptação ácida ou pode representar uma função regulatória que resulta da indução de outros produtos de gene (CANET et al, 2003).

A despeito da maneira como a bactéria pode ser tornar ácido-resistente, a sua habilidade de crescer em pH ácido está relacionada com a sua capacidade de reduzir o pH intracelular (RUSSELL et al, 2000). Estudos indicaram que o pH intracelular da *E. coli* declinaria caso este microrganismo crescesse em pH moderadamente ácido. Todavia, o pH externo não seria o único indutor de resistência à acidez, mas tal resistência estaria altamente correlacionada com a concentração de ácidos voláteis provenientes da fermentação (VFA) no meio de crescimento da *Escherichia coli* (DIEZ-GONZALEZ & RUSSELL, 1999).

Esta correlação pode explicar porque as células de *E. coli* que cresceram em meio contendo carboidrato foram mais ácido-resistentes que aquelas que cresceram sem carboidrato (RUSSELL et al, 2000).

A associação da dieta do bovino com a existência de *E. coli* ácido-resistente no Trato Gastrintestinal do animal pode ser explicada pelo fato de que quando o bovino se alimenta de feno ou capim, alguma fibra passa

do rúmen para o cólon. Todavia, a fermentação da fibra no cólon não gera VFA em uma velocidade rápida suficiente para reduzir o pH. Já o amido, é fermentado mais rapidamente que a fibra, e a fermentação do amido no cólon pode causar um significativo aumento na concentração de VFA e uma redução no pH (RUSSELL et al, 2000).

A existência de *E. coli* ácido-resistente no Trato Gastrintestinal do bovino está relacionada com a transmissão destes microrganismos para humanos, visto que as carcaças podem ser contaminadas com fezes durante o abate do animal e o excremento do bovino é frequentemente usado como um fertilizante (RUSSELL et al, 2000).

3.Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo proposto neste estudo foi identificar as populações de *E.coli* com resistência à acidez, encontradas nas fezes de bovinos que receberam três tipos diferentes de dieta, variando a concentração de concentrado e volumoso, permitindo, desta maneira, mensurar os efeitos da manipulação dietética nas populações de *E.coli* em bovinos.

3.2. Objetivos específicos

- Executar a coleta das amostras de fezes dos bovinos no local designado para este fim;
- A partir do material fecal extraído dos bovinos utilizados no experimento, realizar o cultivo e a identificação bacteriana no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB;
- Com base na análise microbiológica realizada neste trabalho, verificar a relação entre a alimentação bovina e a presença de *E. coli* ácido-resistente nas fezes do bovino.

4. Materiais e métodos

4.1. Localização do experimento

Para a realização deste experimento foram selecionados 39 bovinos da Fazenda Água Limpa, pertencente à Universidade de Brasília (UnB) situada no Distrito Federal na Área de Proteção Ambiental Gama Cabeça de Veado.

4.2. Animais utilizados e dieta utilizada

Foram utilizados 39 bovinos, com idade em torno de 2 anos. Os animais foram divididos em três grupos de treze, sendo cada grupo submetido a um tipo de dieta diferente denominadas de dieta A, Dieta B, Dieta C.

Composição da Dieta A

Composta por 3 Kg / dia de concentrado (Formulação: Milho 59%, Farelo de algodão 20 %, Farelo de soja 15%, Uréia 2 %, Calcário 2% e Sal Mineral 2%) e 15 Kg / dia de silagem de milho e cana (Volumoso).

Composição da Dieta B

Composta por 0,5 Kg / dia de concentrado (Formulação: Milho 71 %, Farelo de soja 23,5 %, Uréia 2,75 % e Sal Mineral 2,75 %) e 6 Kg / dia de silagem de milho e cana (Volumoso).

Composição da Dieta C

Composta unicamente por capim *Brachiaria decumbens* (Volumoso) e sal mineral no cocho.

4.3. Período das coletas e divisão da amostragem por grupo

As coletas de amostras de fezes dos três grupos de animais foram realizadas compreendendo um período de quatro meses.

O grupo de animais alimentados com a dieta A foi o primeiro a ter as fezes coletadas no dia 12/09/06. O segundo grupo, alimentado com a dieta B, foi trabalhado no dia 17/10/06 e o terceiro grupo, alimentado com a dieta C, no dia 7/12/06.

4.4 Coleta das amostras de fezes

As amostras de fezes foram retiradas diretamente da ampola retal dos animais com o uso de luvas de estéreis, e acondicionadas em frascos estéreis, previamente identificados. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas, em bolsa refrigerada, ao Laboratório de Microbiologia Médico Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB, onde foi realizada a análise microbiológica das mesmas.

4.5. Cultivo e Identificação bacteriana

Adequação da diluição das fezes em caldo Luria Bertani

Antes do cultivo e da identificação bacteriana foi realizado um Projeto Piloto para o estabelecimento da diluição adequada em Caldo Luria Bertani comum (pH = 7,2) que permitisse o crescimento de um número viável de microrganismos por grama de fezes. A priori, seguindo os

procedimentos mencionados na literatura científica, 1 grama de cada amostra de fezes foi diluído em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em 9 mL de Caldo Luria Bertani comum (pH = 7,2). Em seguida, foi inoculado 1 mL de cada diluição em 9 mL de caldo Luria Bertani ácido (pH = 2,0) e coletado 1 mL do Luria Bertani ácido (pH = 2,0) após 1 hora de incubação em estufa à 37°C e imediatamente inoculado em Caldo Luria Bertani comum (pH = 7,2), totalizando 13 tubos, sendo incubados em estufa à 37°C *overnight*. Após 24 horas de incubação em estufa à 37°C, foi observado que não havia ocorrido crescimento bacteriano, nos tubos 10^{-4} e 10^{-3} . Com esse resultado foi então eleita a diluição 10^{-2} para a realização do experimento. Foi incluído também dois tipos diferentes de choque ácido, um de 1 hora e outro de 6 horas, permitindo avaliar com mais precisão a resistência à acidez dos microrganismos.

Procedimento de cultivo e identificação bacteriana

Ao chegarem ao laboratório, as amostras de fezes foram numeradas de 1 a 13, dentro de cada dieta, perfazendo o total de 39 amostras diferentes. Em seguida, 1 grama de cada amostra de fezes foi diluído em 10^{-1} e 10^{-2} em 9 mL de Caldo Luria Bertani comum (pH = 7,2) (Anexo) e misturada vigorosamente por 1 minuto. Para o isolamento de possíveis cepas de *E. coli* ácido-resistentes, foi inoculado 1 mL da diluição 10^{-2} anteriormente preparada em 9 mL de caldo Luria Bertani ácido (pH = 2,0) (Anexo) para a realização do choque ácido. Visando uma melhor observação da resistência à acidez das colônias, foi coletado 1 mL do caldo Luria Bertani ácido (pH = 2,0) após uma e seis horas de incubação em estufa à 37°C e imediatamente inoculado em Caldo Luria Bertani comum (pH = 7,2), totalizando 26 tubos, sendo incubados em estufa à 37°C *overnight*. Os tubos contendo caldo Luria Bertani comum, que

apresentaram turvação característica de crescimento bacteriano, foram separados e tiveram alíquotas de 30 µl de seus conteúdos inoculadas em Agar MacConkey®, sendo este incubado por 24 horas à 37°C.

Após o período de incubação em Agar MacConkey®, foi possível o isolamento de colônias fermentadoras ou não fermentadoras de lactose.

Aquelas colônias identificadas como fermentadoras de lactose foram reisoladas e inoculadas em meio BHI para posterior realização de testes bioquímicos, sendo dentre estes inicialmente usados o teste IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato) para a identificação de possíveis *E. coli*.

As colônias sugestivas de *E. coli*, após o teste IMViC, foram inoculadas na bioquímica completa para identificação específica (Os testes bioquímicos utilizados foram: Motilidade, Fenilalanina, Ramnose, Sacarose, Glicose, Lactose, Rafinose, Xilose, Arabinose, Maltose, Arginina, Lisina, Ornitina, Salicina, Gelatina, Malonato, Dulcitol, Sorbitol e Agar TSI, segundo OLIVEIRA, 2000). Finalmente, as colônias identificadas como *E. coli* foram congeladas com 200µl glicerol estéril em 800 microlitros de meio BHI do cultivo, para a realização de estudos futuros com as mesmas.

5. Resultados

Dieta A

Foram utilizadas as diluições 10^{-2} dos 13 animais submetidos à Dieta A. Todas as 13 diluições apresentaram crescimento positivo de *E. coli* ao choque ácido de 1 e de 6 horas, com apenas 1 resultado negativo no choque ácido de 6 horas (ver Tabela 1, Gráficos 1 e 2).

Houve crescimento de uma única colônia não-fermentadora de lactose após incubação em Agar MacConkey (ver Tabela 1). Nesta dieta foi encontrada uma colônia de *E. coli* citrato-positiva, após a realização da bioquímica completa.

Dieta B

No experimento realizado com a Dieta B todas as diluições 10^{-2} submetidas ao choque ácido de 1 hora apresentaram crescimento positivo para *E. coli*. Naquelas amostras submetidas ao choque ácido de 6 horas, apenas uma delas apresentou crescimento característico deste microrganismo. Nas outras 12 amostras de fezes restantes, 6 apresentaram crescimento de colônias não-fermentadoras de lactose e 6 tiveram ausência de crescimento microbiano (ver Tabela 2, Gráficos 1 e 2).

Foi encontrada uma colônia de *E. coli* citrato-positiva, após a realização da bioquímica completa.

Dieta C

No experimento realizado com a Dieta C, em todas as diluições 10^{-2} submetidas ao choque ácido de 1 e de 6 horas, não foi encontrado nenhum crescimento positivo para *E. coli* (ver Tabela 3, Gráficos 1 e 2).

TABELA 1: Relação entre as amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta A e o crescimento de *Escherichia coli* após choque ácido de 1 e de 6 horas.

<i>Amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta</i>	<i>Crescimento de Escherichia coli após choque ácido de 1h</i>	<i>Crescimento de Escherichia coli após choque ácido de 6h</i>
A		
1	Positivo	Negativo*
2	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo
9	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo
12	Positivo	Positivo
13	Positivo	Positivo ¹
Total	13	

* Crescimento de colônia não-fermentadora de lactose

¹ Colônia citrato-positiva

TABELA 2: Relação entre as amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta B e o crescimento de *Escherichia coli* após choque ácido de 1 e de 6 horas.

<i>Amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta B</i>	<i>Crescimento de Escherichia coli após choque ácido de 1h</i>	<i>Crescimento de Escherichia coli após choque ácido de 6h</i>
1	Positivo	Negativo*
2	Positivo	Negativo
3	Positivo	Negativo
4	Positivo	Negativo
5	Positivo	Negativo
6	Positivo	Negativo
7	Positivo ¹	Negativo
8	Positivo	Negativo*
9	Positivo	Negativo*
10	Positivo	Negativo*
11	Positivo	Positivo
12	Positivo	Negativo*
13	Positivo	Negativo*
Total	13	

* Crescimento de colônia não-fermentadora de lactose

¹ Colônia de *E. coli* citrato-positiva

TABELA 3: Relação entre as amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta C e o crescimento de *Escherichia coli* após choque ácido de 1 e de 6 horas.

<i>Amostras de fezes dos bovinos submetidos à Dieta C</i>	<i>Crescimento de Escherichia coli após choque ácido de 1h</i>	<i>Crescimento de Escherichia coli após choque ácido de 6h</i>
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo
Total	13	

* Colônia não-fermentadora de lactose

¹ Colônia citrato-positiva

Gráfico 1: Crescimento positivo de *E.coli* após 1 h de choque ácido nos três tipos de dieta

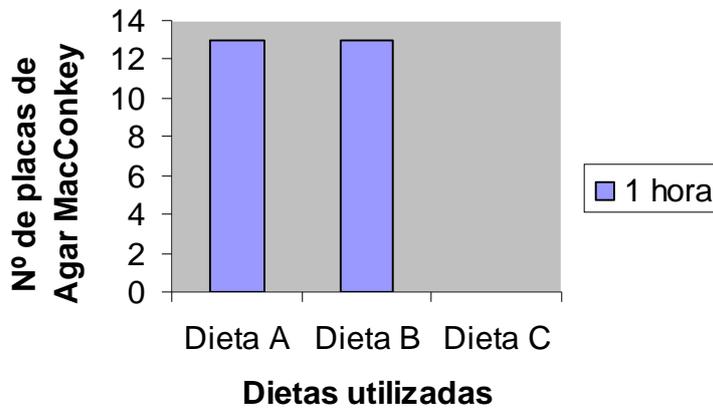
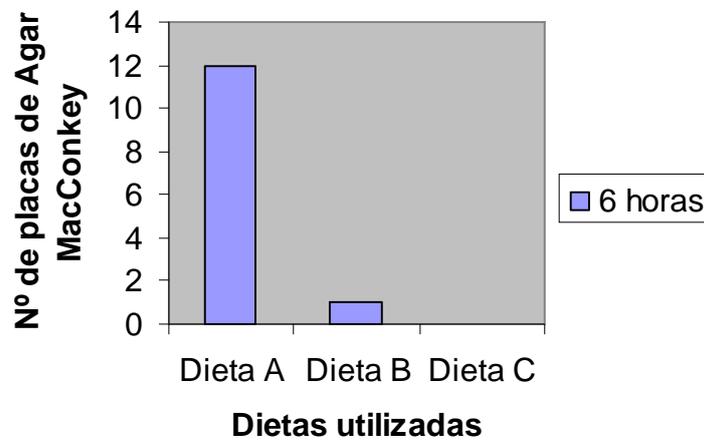


Gráfico 2: Crescimento positivo de *E.coli* após 6 h de choque ácido nos três tipos de dieta



6. Discussão

No presente estudo foi proposto mensurar os efeitos da manipulação dietética nas populações de *E.coli* ácido-resistente em microbiota intestinal de bovinos. Foi verificado que a Dieta A, composta por 3 Kg / dia de concentrado e 15 Kg / dia de silagem de milho e cana (Volumoso), apresentou, juntamente com a Dieta B, 100 % de crescimento positivo de *E.coli* após o choque ácido de 1 hora (Gráfico 1). Já após o choque ácido de 6 horas, a Dieta A obteve 92 % de crescimento positivo de *E.coli* (Gráfico 2). A Dieta B, composta por 0,5 Kg / dia de concentrado e 6 Kg / dia de silagem de milho e cana (Volumoso), embora tenha apresentado, após o choque ácido de 1 hora, o crescimento positivo de *E.coli* idêntico ao da Dieta A (Gráfico 1), apresentou, após o choque ácido de 6 horas, um crescimento positivo de *E.coli* de somente 8 % das amostras testadas (Gráfico 2). A Dieta C, composta unicamente por capim *Brachiaria decumbens* e sal mineral no cocho, não apresentou crescimento de *E.coli* ácido resistente em ambos os tratamentos por choques ácidos (Gráficos 1 e 2). Este resultado apresenta concordância com os achados de DIEZ-GONZALEZ et al (1998), JORDAN & MCEWEN (1998), KEEN et al (1999), GREGORY et al (2000), TKALCIC et al (2000), SCOOT et al (2000), STANTON & SCHUTZ (2000), BOUKHORS et al (2002) e CALLAWAY et al (2003 a) e difere-se dos achados de GRAUKE et al (2003), HOVDE et al (1999) VAN BAALE et al (2004).

Neste trabalho não foram inoculadas cepas de *E.coli* ácido-resistentes nos bovinos devido às condições de biosegurança insatisfatórias do local de coleta das amostras de fezes e ao interesse de descobrir se na microbiota intestinal do bovino havia a presença destes microrganismos. Desta maneira, este estudo assemelhou-se àqueles cujas pesquisas envolveram animais naturalmente infectados, nos quais foi relacionada à

ingestão de feno com a redução da população fecal de *E.coli* ácido-resistente, porém diferiu-se dos experimentos com bovinos inoculados com uma ou mais cepas de *E.coli* ácido-resistentes, nos quais foi associada a ingestão de feno (alfafa no experimento de VAN BAALE et al, 2004; 50% de alfafa e 50 % de gramínea no experimento de GRAUKE et al, 2003) com o aumento ou ausência de efeito na concentração e/ou duração da população microbiana nas fezes (VAN BAALE et al, 2004).

A utilização de amostras de fezes de três grupos de bovinos alimentados com os três tipos diferentes de dieta, permitiu a comparação inter-animais. Este procedimento foi similar ao adotado por KEEN et al (1999), que compararam a população de *E.coli* presente nas amostras de fezes de 2 grupos de bovinos naturalmente infectados com *E.coli* O 157: H7 que receberam dois tipos diferentes de dieta, ao passo que diferiu do experimento realizado por JORDAN & MCEWEN (1998), no qual a comparação foi intra-animais, ou seja, os pesquisadores compararam a população de *E.coli* presente nas amostras de fezes de bovinos que recebiam uma dieta altamente concentrada (rica em grãos) e passaram a receber uma dieta contendo 50% de milho e 50% de feno de alfalfa.

Conforme mencionado anteriormente, embora a utilização de citrato e a produção de H₂S não sejam características típicas de espécies de *Escherichia coli*, estudos recentes têm relatado que plasmídios podem conferir um fenótipo citrato-positivo (Cit⁺) em *Escherichia coli* (HARNETT et al, 1996). Neste trabalho, foram encontradas duas colônias de *Escherichia coli* citrato-positiva, corroborando com os achados de WASHINGTON & TIMM (1976) e ISHIGURO et al (1978). Os primeiros pesquisadores encontraram três cepas de *Escherichia coli* capazes de utilizar o citrato, que foram isoladas de culturas de material clínico submetido ao Laboratório de Bacteriologia. Já os segundos pesquisadores

descobriram vinte e sete isolados de *Escherichia coli* citrato-positiva obtidos de pombos, porcos, cavalos e bovinos.

Faz-se necessário mencionar que dentre os 39 bovinos utilizados neste experimento, somente 1 destes animais estava com diarreia, sendo que os demais estavam hígidos. Deve-se ressaltar que este animal doente foi negativo para *E.coli* ácido-resistente. Esta observação é importante visto que na maioria das amostras de fezes destes bovinos foram isoladas colônias de *Escherichia coli* ácido-resistentes. Isto ratifica a afirmação de muitos estudiosos, que estes patógenos exercem pouco ou nenhum efeito na saúde do ruminante (PRUIMBOOM-BREES et al, 2000). Embora as bactérias patogênicas não sejam nocivas ao bovino, é importante reduzir esta carga microbiana, pois desta maneira o homem poderá estar menos exposto a este microrganismo e assim, decrescerá o número de doenças e mortes associadas à contaminação alimentar (HYNES & WACSMUTH, 2000).

Finalmente, este estudo foi realizado no Brasil, diferentemente dos outros citados na literatura científica, sendo que os últimos foram na maioria executados em países com o clima temperado, logo, os bovinos são produzidos em grande parte no sistema intensivo, contrastando com o sistema de produção no Brasil, cujo confinamento destes animais, em 2003, teria atingido 8% do rebanho existente o país, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

7. Conclusão

O presente estudo confirmou os resultados de diversos autores que sugerem que a ingestão de volumoso pelo bovino reduz a população fecal de *E.coli* ácido-resistente, ao passo que a ingestão de concentrado pelo animal apresenta o efeito inverso. Foi também constatado que a dieta contendo capim *Brachiaria decumbens* não é capaz de selecionar cepas ácido-resistentes, ao contrário daquelas que contém concentrado e silagem.

Considerando que no Brasil já foram isoladas cepas patogênicas de *E.coli*, torna-se de fundamental importância a adoção de estratégias para reduzir este patógeno nos alimentos. Além da manipulação dietética em bovinos, outras estratégias devem ser adotadas, como as boas práticas de fabricação, tais como evitar a contaminação da carcaça com fezes durante o abate e cozinhar o alimento em temperatura ideal, a fim de prevenir a disseminação e a infecção por *E.coli* ácido-resistente.

8. Referências Bibliográficas

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais** domésticos. Editora Roca, 1ed, São Paulo, 1999, 380p.

BENENSON, A.S. **Manual para el controle de las enfermedades transmisibles**. Ed. Benenson, 16 ed., Washington, 1997.

BENJAMIN, M.M. ; DATTA, A.R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied Environ. Microbiology**, v.61, p.1669-1672, 1995.

BETTELHEIM, K.A. et al. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, Austrália, v. 98, p. 699-709, 2005.

BOUKHORS, K. et al. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (STEC) growth and survival in rumen and abomasums fluids. **Vet. Res.**, França, v.33, p. 405-412, 2002.

CANET, S. et al. Involvement of phospholipids in resistance and adaptation of *Escherichia coli* to acid conditions and to long-term survival. **FEMS Microbiology Letters**, França, v. 225, p. 207-211, 2003.

CALLAWAY, T.R. et al. What are we doing about *Escherichia coli* O 157: H 7 in cattle? **Food and Feed safety Research Unity**, EUA, v.86, p. 93-99, 2003 a.

CALLAWAY, T.R. et al. Preslaughter intervention strategies to reduce food-borne pathogens in food animals. **J. Anim. Sci.**, EUA, v.81, n. 2, p. 17-23, 2003 b.

CALLAWAY ,T.R. et al. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a Review. **J. Dairy Sci.**, EUA, v.82, p. 93-99, 2003 c.

CARTER, G.R. **Fundamentos de Bacteriologia e Microbiologia Veterinária**. Editora Roca, 1 ed, São Paulo,1998.

CHANG, Y.Y. ; CRONAN Jr., J.E. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, EUA, v.33, n.2, p.249-259, 1999.

COIA, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O 157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Inglaterra, v.20, p.1-9, 1998.

CONEDERA, G. et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O 157 in minced beef and dairy products in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Itália, v.96, p.67-73, 2004.

CORNICK, N.A. et al. Intimin Facilitates Colonization by *Escherichia coli* O 157: H 7 in Adult Ruminants. **Infection and Immunity**, EUA, v.70, n.5, p.2704-2707, 2002.

DIEZ-GONZALEZ, F. et al. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* O 157: H 7. **Food Microbiology**, EUA, v.95, p.211-225, 2003.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, 1 ed, São Paulo, 1996. 182p.

FRANCO, R.M. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana**. 2002.144 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói / RJ.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, n. 4, p.359-363, 2005.

GREGORY, N.G. et al. Effect of peslaughter feeding system on weight loss, gut bacteria and the physico-chemical properties of digesta in cattle. **J. Agric. Res.**, n.2, p.351-361, 2000.

GRAUKE, L.J. et al. Acid resistance of *Escherichia coli* O 157: H 7 from gastrointestinal tract of cattle fed hay or grain. **Veterinary Microbiology**. v. 95, p.211-225, 2003.

GUTH, B.E.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – An Overview. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**. v.95, p.95-97, 2000.

GUTH, B.E.C. et al. Phenotypic and Genotypic Characteristic of Shiga Toxin – producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.8, p.1085-1089, 2002.

HARNET, N. et al. Thermosensitive Transfer of Antimicrobial Resistances and Citrate Utilization and Cotransfer of Hydrogen Sulfide Production From an *Escherichia coli* Isolate. **Bacteriology**. v. 24, p.173-178, 1996.

HIRSH, D.C. e ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan, 1 ed., Rio de Janeiro, 2003. 464p.

HOVDE, C. J. et al. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O 157: H 7 acid resistance. **App. Environ. Microbiol.**, v.65, p.3233-3235, 1999.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants from basics to the brink. **J. Anim. Sci.** , v.75, p.852-867, 1997.

HYNES, N.A. ; WACSMUTH, I.K. *Escherichia coli* O 157: H7 risk assessment in ground beef. **A public health tool**, p.46, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 1995-1996, Brasil**. Rio de Janeiro. 1998. 366p.

JARDIM, F.B.B. et al. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.2, p. 277-282, 2006.

JORDAN, D., MCEWEN, S.A. Effect of duration of fasting and a short-term high-roughage ration on the concentration of *Escherichia coli* biotype 1 in cattle feces. **J. Food Prot.**, v. 61, p. 531-534, 1998.

KEEN, J.E. et al. Effects of hay and grain based diets on fecal shedding in naturally-acquired enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in beef feedlot cattle. **In 80th Conf. Res. Workers in Anim. Dis.**, Chicago, 1999.

KIJIMA-TANAKA, M. et al. A National Surveillance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in Food-Producing Animals in Japan. **National Veterinary Assay Laboratory**, v.52, p.230-237, 2005.

NAYLOR, S.W. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p.419-441, 2005.

NOWAK, B. et al. Trends in the production and storage of fresh meat – the holistic approach to bacteriological meat quality. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p.303-310

OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária**. Editora da Ulbra, 2 ed., Canoas, 2000. 237p.

PARMA, A.E. et al. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, p.757-762, 2000.

PRUIMBOOM-BREES, I.M. et al. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p. 10325-10329, 2000.

QUINN, P.J. *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**. Grafos: Spain, 1994. 648p.

QUINTANILLA, L.B.Z. **Anticorpos séricos anti *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) em adultos saudáveis da Grande São Paulo**. 2005. 73 f. Dissertação (MESTRADO EM Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIGOBELLO, E.C. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 3, p. 305-310, 2006.

ROWBURY, R.J. et al. Extracellular proteins and other components as obligate intermediates in the induction of a range of acid tolerance and sensitization responses in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.166, p.283-288, 1998.

ROWBURY, R.J. ; GOODSON, M. Induction of acid tolerance at neutral pH in log-phase *Escherichia coli* by medium filtrates from organisms grown at acidic pH. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 447- 451, 1998.

RUSSEL, J.B. et al. Invited Review: Effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 863-873, 2000.

RUSSEL, J.B.; RYCHLINK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, maio, 2001.

SANDRINI, C.N. M. et al. *Escherichia coli* Verotoxigênica :isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.175-182, 2007.

SILVA JÚNIOR, E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1999.

SCOOT, T. et al. Influence of diet on total and acid resistant *E. coli* and colonic pH. **2000 Nebraska Beef Rep.**, p. 39-41, 2000.

SOUSA, S.P. The Versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes:: A mini review. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v.12, n.3, p.363-373, 2006.

STANTON, T.L.; SCHUTZ, D. Effect of switching from high grain to hay five days prior to slaughter on finishing cattle performance. **Colorado State Univ. Research Report.F.C. Collins**, Colorado, 2000.

TAXONOMY OUTLINE OF THE PROKARYOTES BERGEY'S MANUAL® OF SISTEMATIC BACTERIOLOGY, SECOND EDITION. Nova Iorque, 2004. Disponível em: <www.bergeysoutline>. Acesso em 16/06/2006.

TKALCIC, S.C. et al. Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. **J. Food Prol.**, v. 63, p. 1630-1636, 2000.

TONI, F. et al. Detecção de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes Stx. **RBAC**, v. 36, p. 73-77, 2004.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, 2005, 679p.

VAN BRALE, M et al. Effect of forage or grain diets with or without Monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia Coli* O157:H7 in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.9, p. 5336-5342, setembro, 2004.

VICENTE, H. I. G. et al. Shigatoxigenic *Escherichia coli* Serogroups O 157, O 111 and O 113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.217-222, 2005.

VUDDHAKUL, V. et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O 157 from retail beef and bovine feces in Thailand. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p.343-347, 2000.

WASHINGTON, J ; TIMM, J.A. Unclassified, Citrate-Positive Member of the Family *Enterobacteriaceae* Resembling *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, n.2, p. 165-167, 1976.

Anexo

Fórmula do Caldo Luria Bertani comum (pH = 7,2)

Ingrediente	Quantidade
Peptona	10 g/ L
Extrato de levedura	5 g/ L
NaCl	10 g/ L
Água destilada	1 L/ L

Fórmula do Caldo Luria Bertani ácido (pH = 2,0)

Ingrediente	Quantidade
Peptona	10 g/ L
Extrato de levedura	5 g/ L
NaCl	10 g/ L
Água destilada	1 L/ L
HCl	Até alcançar o pH = 2,0