

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

FRANCESCA SILVA DIAS

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA
PRESENTE EM VESÍCULA BILIAR DE BOVINOS ABATIDOS EM
MATADOURO FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

NITERÓI/RJ

2008

FRANCESCA SILVA DIAS

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA
PRESENTE EM VESÍCULA BILIAR DE BOVINOS ABATIDOS EM
MATADOURO FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. IACIR FRANCISCO DOS SANTOS - UFF

Co-Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO - UFF

Niterói/RJ

2008

FRANCESCA SILVA DIAS

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE
EM VESÍCULA BILIAR DE BOVINOS ABATIDOS EM MATADOURO
FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. IACIR FRANCISCO DOS SANTOS
UFF

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO
UFF

Prof. Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO
UFF

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO DE ARRUDA PINTO
UFV

Niterói/RJ
2008

**À minha querida mamãe Etelvira e à minha irmã Mariana, pelo apoio,
auxílio, carinho, compreensão, incentivo e exercício constante do amor**

Ao Fernando, por seu amor incondicional

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as pessoas que cruzam o meu caminho e doam um pouquinho de si edificando-me espiritualmente. Em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iacir Francisco do Santos pela grande acolhida, amizade, apoio e carinho. Profissional que sempre admirei pela experiência técnica na área e que hoje o admiro mais ainda como pessoa, por exemplo de humildade, como amigo e como pai. Minha mais sincera e profunda gratidão.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Robson Maia Franco que pacientemente me orientou e transmitiu muito conhecimento técnico em microbiologia de alimentos, sempre dedicado, competente e perseverante no trabalho científico. Muito obrigada por me auxiliar em alcançar esta etapa eminente na vida. Que Deus continue sempre o iluminando na busca e propagação do conhecimento.

Ao erudito Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela grande ajuda na análise estatística, interpretação dos dados e valiosa contribuição para enriquecimento deste trabalho.

Aos funcionários e gerente do matadouro-frigorífico de Barra Mansa - RJ pela colaboração e permissão para coleta de material.

Ao técnico do laboratório Alcinez Paes Fidelis que estava sempre disposto a me auxiliar (e ensinar) em várias etapas da rotina laboratorial.

Às minhas amigas Kênia de Fátima Carrijo, Mayara Souza Pinto, Janaína Moreira Rei, Ana Carolina Vasques, Cristiane Cândido e Marcy Fonseca pelo amparo, força, companheirismo e coragem. Com certeza vocês tornaram minha vida mais bela.

Ao colega José Luiz Gomes de Azevedo que desde o início se preocupou em dar dicas culturais importantíssimas para um excelente final de semana.

Ao Professor Dr. Paulo Sérgio Arruda Pinto, com quem tive oportunidade de conviver durante quatro anos e muito contribuiu para minha formação acadêmica e científica. Sou eternamente grata.

À CNPq pela bolsa de estudo concedida, sem a qual não poderia obter este título.

O Meu Olhar

O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de andar pelas estradas
Olhando para a direita e para a esquerda,
E de, vez em quando olhando para trás...
E o que vejo a cada momento
É aquilo que nunca antes eu tinha visto,
E eu sei dar por isso muito bem...
Sei ter o pasmo essencial
Que tem uma criança se, ao nascer,
Reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo...

Alberto Caeiro/Fernando Pessoa

RESUMO

O bovino possui uma microbiota residente na pele e trato digestivo que é transferida às carcaças durante o abate e atenção maior deve ser dada ao trato gastrintestinal, principalmente à vesícula biliar, que mesmo apresentando características adversas como variações no pH e elevada osmolaridade, é descrita como um potente abrigo para diversas bactérias. Isto porque os microrganismos vêm desenvolvendo mecanismos para tolerar a bile, como alterações de proteínas que governam a arquitetura da membrana da célula e a manutenção da homeostase intracelular. Foram coletadas 30 vesículas biliares íntegras de bovinos abatidos em matadouro frigorífico sob inspeção sanitária com o intuito de pesquisar bactérias presentes no líquido e epitélio. Os microrganismos em estudo foram Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM), gênero *Staphylococcus* e Enterobactérias segundo Brasil (2003); *E. coli* e *Enterococcus* spp. conforme Merck (2000) com modificações pertinentes, e *Salmonella* spp. segundo metodologia descrita por Pignato (1995). Na pesquisa também foi realizado teste de sensibilidade a antimicrobianos com estirpes isoladas do gênero *Salmonella* e *Staphylococcus*. A frequência de isolamento de BHAM, gênero *Staphylococcus*, enterobactéria, *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *Salmonella* spp. foi, respectivamente: 23,02%, 14,39%, 13,67%, 24,46%, 0% e 24,46%. Em relação aos dois ambientes da vesícula, a frequência de isolamento dos microrganismos no epitélio foi de 64,03%, e no líquido: 35,97%, não sendo diferente estatisticamente no teste Qui-quadrado ($p > 0,05$), mas com diferença significativa entre as médias populacionais verificadas no teste t de Student ($p < 0,05$). No teste de sensibilidade a antimicrobianos, estirpes de *Salmonella* spp. e o gênero *Staphylococcus* apresentaram maior média de resistência aos fármacos no líquido biliar e a frequência de sensibilidade dos microrganismos pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$) a alguns fármacos foi maior quando estes se encontraram no epitélio vesical. Para o gênero *Staphylococcus* o antimicrobiano de escolha foi: penicilina G, ceftriaxona, cloranfenicol e gentamicina e para *Salmonella* spp.: aztreonam, porém houve a ocorrência de salmonelas resistentes aos doze antimicrobianos testados. A observação de que a vesícula biliar comporta muitos microrganismos em elevadas frequências atenta-nos para o fato de que o bovino possa ser um portador persistente de patógenos de grande importância em saúde coletiva, e sendo assim o Serviço de Inspeção Oficial deve rever novos procedimentos para a técnica usual da compressão da vesícula biliar, a fim de evitar o derramamento de bile sobre a superfície do fígado.

Palavras-chave: vesícula biliar, bovino, bactérias, resistência, antimicrobiano, patógenos.

ABSTRACT

The cattle have a resistant microbiote in the skin and digestive tract which are transferred to the carcass during slaughter. Because of that, more attention should be given to the gastrointestinal tract, especially to the gallbladder, which, even though presents adverse characteristics such as pH variations and high osmolarity, it is described as a potent habitat for several bacteria. This is because the microorganisms have been developing mechanisms to tolerate the bile, such as protein alterations which dominate the construction of the cell's membrane and maintenance of intracellular homeostasis. Thirty full gallbladders were collected of cattle slaughtered in slaughterhouses under sanitary inspection with the purpose to research bacteria present in the liquid and epithelium. The microorganisms in study were Heterophilic Aerobic Mesophilic Bacteria (HAMB), genus *Staphylococcus* and Enterobacteria in agreement to, Brazil (2003); *E. coli* e *Enterococcus* spp. as Merck (2000) with appropriate modifications, and *Salmonella* spp. according to the methodology described by Pignato (1995). During research, an anti-microbial sensitivity test was also done for isolated strains of *Salmonella* and *Staphylococcus* genus. The isolation frequency of HAMB of *Staphylococcus*, Enterobacteria, *E. coli*, *Enterococcus* spp. and *Salmonella* spp genus was, respectively: 23.02%, 14.39%, 13.67%, 24.46%, 0% and 24.46%. Concerning both environments of the gallbladder, the isolation frequency of the microorganisms in the epithelium was 64.03%, and in the liquid 35.97%, with no statistical difference in Chi-Square test ($p > 0.05$), but with significant difference between the population averages ascertained in the t Student test ($p < 0.05$). In the anti-microbial sensitivity test, *Salmonella* spp. strains and *Staphylococcus* genus had the highest average of resistance to drugs in the biliary liquid and the sensitivity frequency of microorganisms by Fisher's exact test ($p < 0.05$) to some drugs was greater when these bacteria were found in the biliary epithelium. For the *Staphylococcus* genus the antimicrobials of choice were: penicillin G, ceftriaxone, chloramphenicol and gentamicin, and for *Salmonella* spp.: aztreonam. However, in strain salmonella multidrug resistance occurred. The observation that the gallbladder supports a high frequency of several microorganisms brings us to the possible fact that the cattle might be a persistent carrier of pathogens of great importance to collective health and thus, the sanitary inspection services should review news procedures for the common technique of gallbladder compression to avoid bile spill over the liver surface.

Key-words: gallbladder, cattle, bacteria, resistance, antimicrobial, pathogens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig 1 Sistema hepatobiliar, f. 24
- Fig 2 Circulação entero-hepática dos sais biliares e digestão dos lipídeos. Linhas tracejadas indicam a circulação entero-hepática dos sais biliares. TG: Triacilglicerol; MG: Monoacilglicerol; FA: Ácidos graxos de cadeia longa, f. 30
- Fig 3 Parede celular de bactérias Gram negativas. Arranjo do polissacarídeo, f. 38
- Fig 4 Mecanismo hipotético da bomba de efluxo. (A) Movimento de “flip-flop” do lipídeo na membrana. (B) A atividade de bomba de efluxo da proteína expressa pelo gene *acrAB* que captura o substrato no lado interno e externo da membrana, f. 39
- Fig 5 Freqüência relativa (%) do isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva no líquido vesical, f. 86
- Fig 6 Freqüência relativa (%) do isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva no epitélio vesical, f. 86
- Fig 7 Número de estirpes de *Salmonella* spp. resistentes a multifármacos isoladas de líquido biliar e epitélio vesical de bovinos, f. 89
- Fig 8 Número de estirpes do gênero *Staphylococcus* resistentes a multifármacos isoladas de líquido biliar e epitélio vesical de bovinos, f. 91
- Fig 9 No frigorífico, a vesícula biliar ainda aderida ao fígado, f. 127
- Fig 10 Epitélio vesical, f. 127

- Fig 11 Epitélio da vesícula biliar sendo retirado para a pesquisa, f.127
- Fig 12 Epitélio da vesícula biliar sendo retirado para a pesquisa, f. 127
- Fig 13 Cálculo biliar presente na vesícula de nº 30, f. 128
- Fig 14 Teste confirmativo de *E. coli*: fluorescência positiva e Kovac's positivo, f. 128
- Fig 15 Teste confirmativo de *E. coli*: fluorescência positiva e Kovac's positivo, f. 128
- Fig 16 Ágar VRBG com crescimento sugestivo de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, f. 128
- Fig 17 Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Bactérias Gram negativas, f. 128
- Fig 18 Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Bactérias Gram negativas, f. 128
- Fig 19 Teste de Oxidase negativo para identificação da família *Enterobacteriaceae*, f. 129
- Fig 20 Teste de O/F da glicose negativo para identificação da família *Enterobacteriaceae*. Os dois tubos deveriam apresentar coloração amarela, f. 129
- Fig 21 Teste de redução de nitrato para identificação da família *Enterobacteriaceae*. O tubo vermelho indica redução e no tubo incolor foi adicionado pó de zinco e como permaneceu incolor, caracteriza redução completa do nitrato, f. 129
- Fig 22 Ágar Baird Parker com crescimento sugestivo de *Staphylococcus aureus*, f. 130
- Fig 23 Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Presença de cocos Gram positivos, f. 130
- Fig 24 Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Presença de cocos Gram positivos, f. 130
- Fig 25 Teste da catalase. O tubo da direita é catalase positiva. Estirpes de *S.aureus* são catalase positivas, f. 130
- Fig 26 Teste da coagulase. No fundo do "ependorf" ocorre a formação de um coágulo. Estirpes de *S.aureus* são coagulase positivas, f. 131

- Fig 27 Teste O/F glicose e manitol. Resultado negativo, pois estirpes de *S. aureus* realizam oxidação e fermentação da glicose e manitol, devendo então ocorrer a viragem dos tubos para amarelo, f. 131
- Fig 28 Teste de DNase. A presença de coloração rosa ao redor indica prova positiva. Estirpes de *S.aureus* são DNase positivas, f.131
- Fig 29 Ágar Rambach com crescimento de colônias sugestivas de *Salmonella* spp. (exceção colônias verdes), f. 132
- Fig 30 Foco em uma colônia no Ágar Rambach sugestiva de *Salmonella* spp., f. 132
- Fig 31 Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram, f. 132
- Fig 32 Prova indicativa de *Salmonella* spp. no Ágar TSI, f. 132
- Fig 33 Reação de aglutinação frente ao soro polivalente anti-*Salmonella*, f. 133
- Fig 34 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Halo ao redor do antimicrobiano é indicativo de sensibilidade, f. 133
- Fig 35 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Halo ao redor do antimicrobiano é indicativo de sensibilidade, f. 133
- Fig 36 Estirpe resistente aos fármacos testados, f. 133

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Presença de *Salmonella* spp. por amostras de vesículas biliares, f.116
- Quadro 2 Contagem de Bactéria Heterotrófica Aeróbia Mesófila por amostras de vesículas biliares, f.117
- Quadro 3 Enumeração de *E.coli* por amostras de vesículas biliares, p.118
- Quadro 4 Contagem e identificação bioquímica de enterobactérias por amostras de líquido biliar, f.119
- Quadro 5 Contagem e identificação bioquímica de enterobactérias por amostras de epitélio vesical, f.120
- Quadro 6 Identificação do gênero *Staphylococcus* por amostras de líquido biliar f.121
- Quadro 7 Identificação do gênero *Staphylococcus* por amostras de epitélio vesical, f.122
- Quadro 8 Dados gerais do isolamento do gênero *Staphylococcus* de 30 amostras de líquido biliar, f.123
- Quadro 9 Dados gerais do isolamento do gênero *Staphylococcus* de 30 amostras de epitélio vesical, f. 123
- Quadro 10 Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos, f.123
- Quadro 11 Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos, f.124
- Quadro 12 Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos, f.124
- Quadro 13 Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos, f.125

- Quadro 14 Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos, f.125
- Quadro 15 Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos, f.125
- Quadro 16 Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos, f.126
- Quadro 17 Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos, f.126

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Composição da bile, f. 26
- TABELA 2- Frequências de isolamento por tipo bacteriano nas amostras, f. 85
- TABELA 3 - Média da contagem dos microrganismos presentes no líquido e epitélio da vesícula biliar, f. 87
- TABELA 4- Porcentagem de estirpes de *Salmonella* spp. isoladas do líquido e epitélio da vesícula biliar de bovinos resistentes a antimicrobianos, f. 88
- TABELA 5- Número de fármacos que estirpes de *Salmonella* spp. isoladas no líquido e epitélio de uma mesma vesícula biliar apresentaram resistência, f. 88
- TABELA 6 - Porcentagem de estirpes do gênero *Staphylococcus* isoladas do líquido e epitélio da vesícula biliar de bovinos resistentes a antimicrobianos, f. 90
- TABELA 7- Número de fármacos resistentes para estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa (19) e *Staphylococcus* coagulase positiva (23) isoladas no líquido e epitélio de uma mesma vesícula biliar, f. 90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Aa	Atividade de água
Acr	“Across”
AEC	Antígeno Enterobacteriano Comum
AMP	Adenosina Monofosfato
APC	Ágar Padrão para Contagem
APPCC	Análise de Perigo e Ponto Crítico de Controle
BHAM	Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
BHI	“Brain Heart Infusion”
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BSH	“Bile Salt Hydrolase”
°C	Grau Celsius
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CDO	Cetodesoxioctonato
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
cm	Centímetro
Co-A	Coenzima A
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
Da	Dalton
DAEC	“Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i> ”
DME	Diagnóstico Microbiológico Especial
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EaggEC	“Enteraggative <i>Escherichia coli</i> ”
ECN	Estafilococos Coagulase Negativa

EHEC	“Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> ”
EIEC	“Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> ”
emr	“Efflux Multidrug”
EPEC	“Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ”
EPS	Exopolissacarídeo
ETEC	“Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FAO	“Food and Agricultural Organization”
g	Gramma
G/C	Guanina/Citosina
CH	Colite Hemorrágica
HIV	“Human Immunodeficiency Vírus”
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPA	“Integral Protein Adherence”
IPTG	“1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo”
IV	Intravenoso
KDa	KiloDalton
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	“Labile Toxin”
mar	“Multiple Antibiotic Resistent”
MBC	“Minimal Bactericidal Concentration”
mg/d	Miligramma por dia
mg/Kg	Miligramma por kilogramma
mL	Mililitro
mOsm/Kg	Miliosmole por kilo
MUG	“4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo”
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMP	Número Mais Provável

pH	Potencial hidrogeniônico
pho	“Phosphorylated”
Plasmídeo R	Plasmídeo de Resistência
O/F	Oxidação e Fermentação
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OMP	“Protein Membrane Outer”
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
SPI-1 TTSS	“ <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island 1 Typhimurium Type III Secretion System”
SPA	“Surface Polysaccharide Antigen”
ST	“Stabile Toxin”
TSI	“Triple Sugar Iron”
tol	“Tolerance”
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFF	Universidade Federal Fluminense
UV	Ultravioleta
VPS	“Vibrio Polysaccharide Synthesis”
VRBG	“Violet Red Bile Glucose”
VTEC	Verotoxigênica <i>E. Coli</i>
X-GAL	“5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosideo”
X-GLU	“5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glicopiranosideo”
WHO	“World Health Organization”
α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 21

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 23

2.1 VESÍCULA BILIAR E SECREÇÃO DA BILE, p. 23

2.2 COMPOSIÇÃO DA BILE, p. 25

2.3 OS SAIS BILIARES E SUA FUNÇÃO, p. 26

2.4 CIRCULAÇÃO ENTERO-HEPÁTICA DOS SAIS BILIARES, p. 29

2.5 PRESENÇA DE BACTÉRIAS NA VESÍCULA BILIAR, p. 31

2.6 AÇÃO ANTIMICROBIANA DA BILE, p. 33

2.7 MECANISMOS ADAPTATIVOS DOS MICRORGANISMOS PARA SOBREVIVER
EM À AÇÃO DA BILE, p. 36

2.7.1 Lipopolissacarídeo (LPS), p. 37

2.7.2 Bomba de efluxo, p. 38

2.7.3 Expressão de genes que conferem resistência bacteriana à bile, p. 39

2.8 MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR DE IMPORTÂNCIA
PARA SAÚDE PÚBLICA, p. 41

2.8.1 *Salmonella* spp., p. 41

2.8.1.1 Taxonomia e características de *Salmonella* spp., p. 41

2.8.1.2 *Salmonella* spp. e saúde coletiva, p. 44

2.8.1.3 Epidemiologia, p. 45

2.8.1.4 Patogênese e sinais clínicos, p. 48

2.8.1.5 Medidas de controle e prevenção, p. 50

2.8.2 *Escherichia coli*, p. 51

- 2.8.2.1 Taxonomia e característica de *E. coli*, p. 51
- 2.8.2.2 *E. coli* e saúde coletiva, p. 53
- 2.8.2.3 Epidemiologia, p. 54
- 2.8.2.4 Patogênese e sinais clínicos, p. 56
- 2.8.2.5 Medidas preventivas, p. 59
- 2.8.3 *Staphylococcus aureus***, p. 60
 - 2.8.3.1 Taxonomia e características de *Staphylococcus aureus*, p. 60
 - 2.8.3.2 *Staphylococcus aureus* e saúde coletiva, p. 62
 - 2.8.3.3 Epidemiologia, p. 64
 - 2.8.3.4 Patogênese e sinais clínicos, p. 65
 - 2.8.3.5 Medidas preventivas, p. 66
- 2.9 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, p. 67

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 71

- 3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS, p. 71
- 3.2 MATERIAL, p. 71
- 3.3 BACTERIOLOGIA, p. 71
 - 3.3.1 Miniaturização dos procedimentos convencionais**, p. 72
 - 3.3.2 Preparo das amostras**, p. 72
 - 3.3.3 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM)**, p. 73
 - 3.3.4 Contagem de *Staphylococcus aureus***, p. 74
 - 3.3.5 Contagem de Enterobactérias**, p. 77
 - 3.3.6 Enumeração de *E. coli***, p. 79
 - 3.3.7 Enumeração de *Enterococcus spp.***, p. 80
 - 3.3.8 Pesquisa de *Salmonella spp.***, p. 81
 - 3.3.9 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**, p. 83
- 3.4. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA, p. 83

4 RESULTADOS, p. 85

- 4.1 FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR, p. 85
- 4.2 MÉDIA DA CONTAGEM DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR, p. 87
- 4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 87

4.3.1 *Salmonella* spp., p. 87

4.3.2 Gênero *Staphylococcus*, p. 89

5 DISCUSSÃO, p. 92

5.1 FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR, p. 92

5.2 MÉDIA DA CONTAGEM DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR, p. 94

5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 95

5.3.1 *Salmonella* spp., p. 95

5.3.2 Gênero *Staphylococcus*, p. 96

6 CONCLUSÕES, p. 99

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 101

8 APÊNDICE, p.116

8.1 PERFIL BACTERIOLÓGICO DAS AMOSTRAS ANALISADAS, p. 116

8.2 FOTOGRAFIAS, p. 127

1 INTRODUÇÃO

O bovino possui uma microbiota natural residente e transitória na pele e trato digestivo que, inevitavelmente, é transferida às carcaças durante os processos de abate possibilitando a contaminação por bactérias patogênicas durante a obtenção da carne a partir do animal vivo até o processamento e consumo (SHERIDAN, 1998).

Durante o abate, atenção maior deve ser dada ao trato gastrintestinal de bovinos, principalmente por ser implicado primariamente como reservatório de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* O157:H7 entre outros microrganismos (CONTREPOIS et al., 1986; NOSKIN et al.,1991; ONYEKABA; NJOKU, 1986; SCHABERG et al., 1991). Destaca-se a vesícula biliar que mesmo apresentando características adversas como variações no pH, baixo nível de oxigênio, limitação de nutrientes e elevada osmolaridade, é descrita atualmente como um potente abrigo para diversas bactérias (BEGLEY et al., 2005). Stoffregen e Nystrom (2004a) relataram a presença de *E. coli* na vesícula biliar de bovinos, levando a ocorrência de contaminação do fígado e a incidência de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) em humanos.

Apesar de condições adversas, os microrganismos ao se abrigarem na vesícula biliar escapam do sistema imunológico, uma vez que para Correia et al. (2001) a bile deprime a produção de imunoglobulinas. Somando-se a este fato, as bactérias possuem um grupo de genes que permite sua multiplicação e crescimento dentro da vesícula sem causar sintomas no hospedeiro. Segundo Begley (2005) a habilidade de um organismo tolerar a bile é complexa e envolve um extenso arranjo de proteínas, incluindo muitas que governam a arquitetura da membrana da célula ou manutenção da homeostase intracelular. Assim, estes mecanismos permitem ao

microrganismo sua permanência, colonização e, a exemplo de salmonelas, segundo Prouty et al. (2002), a formação de biofilme na vesícula biliar, desencadeando o estabelecimento de portadores crônicos assintomáticos e, mais tarde, acarretando em doenças crônicas.

Muitos mecanismos adaptativos desenvolvidos pelos microrganismos para resistirem à ação da bile são correlacionados também com resistência a antimicrobianos, como a bomba de efluxo, descrita por muitos pesquisadores (ALEKSHUN; LEVY, 1997; MAHAMOUD, et al., 2007; NIKAIDO et al., 1998), que expulsa quaisquer compostos tóxicos da célula através da membrana coordenado pelo gene *AcrAB*.

Em relação à transmissão horizontal entre as espécies, a inspeção sanitária de animais abatidos pode fornecer uma valiosa contribuição para a pesquisa de doenças animais específicas, particularmente as zoonoses e as doenças exóticas, pois a inspeção *ante e post mortem* atua no controle e na redução de patógenos importantes para a saúde coletiva. Porém, na regulamentação vigente disponível para o Serviço de Inspeção Federal deve-se questionar a técnica utilizada para o exame *post mortem* de fígados bovinos, considerando a existência de microrganismos na vesícula biliar. A legislação recomenda exame visual e a palpação de toda a superfície do órgão, e também, o exame visual e por palpação com compressão da vesícula biliar, incisando-a se necessário para pesquisa de lesões e cálculos biliares que possuem alto valor comercial, contribuindo para o derramamento da bile sobre o fígado.

Como as alterações políticas governamentais de muitos países exigem cada vez mais o aumento significativo de recursos para proteção da saúde do consumidor, os profissionais do serviço veterinário oficial devem permanecer atentos às técnicas aplicadas internamente no país, para exercerem corretamente a responsabilidade de evitar a transmissão de agentes etiológicos via cadeia alimentar, assegurando assim a qualidade dos alimentos no comércio local e internacional.

Orientando-se através de diversos estudos que relatam a resistência e a persistência de microrganismos na bile, objetivou-se com esse trabalho estudar a microbiota bacteriana presente em vesícula biliar de bovinos abatidos em matadouro frigorífico sob inspeção sanitária, correlacionando também a população bacteriana e a sua sensibilidade aos antimicrobianos no líquido e epitélio vesical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VESÍCULA BILIAR E SECREÇÃO DA BILE

A vesícula biliar é um órgão sacular em forma de pêra com estrutura histológica extremamente simples, constituída de células cilíndricas altas com núcleos orientados basalmente e microvilos proeminentes. Células caliciformes ocasionalmente ocorrem entre as células epiteliais, especialmente nos grandes ruminantes. A lâmina própria é composta de tecido conjuntivo frouxo. Como não há a camada muscular da mucosa, a lâmina própria une-se à submucosa sem uma clara linha de junção. Tecido linfático, difuso ou nodular podem estar presente no tecido conjuntivo. Geralmente não há glândulas na mucosa na maioria das espécies, porém quando a mucosa encontra-se vazia são projetadas numerosas dobras conferindo à vesícula uma morfologia glandular; estas invaginações são denominadas seios de Rokitansky-Aschoff. Em determinadas espécies, como nos ruminantes, a mucosa é constituída de glândulas verdadeiras. As fibras musculares lisas dispostas em várias direções da vesícula biliar são supridas por nervos tanto simpáticos como parassimpáticos (GARTNER; HIALT, 2002; STINSON; CALHOUN, 1982).

Esta pequena bolsa muscular armazena e concentra a bile e a libera em resposta ao hormônio colecistoquinina das células enteroendócrinas. A bile é uma secreção digestiva viscosa produzida continuamente pelos hepatócitos pericentrais do fígado e secretada em pequenos canalículos, que se situam entre as células hepáticas, fluindo então para os ductos hepáticos. A bile sai do fígado através dos ductos hepáticos direito e esquerdo, os quais se unem para formar o ducto hepático comum. Em seguida, o ducto une-se a um outro proveniente da vesícula biliar, denominado ducto cístico, formando o ducto biliar comum que desemboca no intestino delgado (na sua parte superior), ao nível do esfíncter de Oddi, no intestino

delgado, alguns centímetros abaixo do estômago (FIGURA 1). Aproximadamente 50% da bile secretada entre as refeições é desviada através do ducto cístico para a vesícula biliar (BEGLEY et al., 2005; GUYTON, 1996; HARPER et al., 1982).

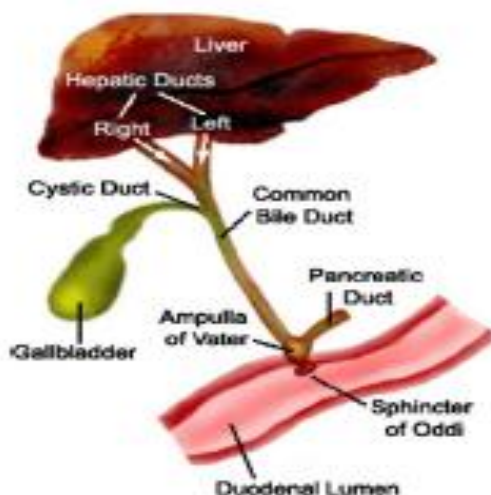


FIGURA 1. Sistema hepatobiliar.
Fonte: BEGLEY et al., 2005.

A bile, em humanos, é continuamente secretada pelas células hepáticas e normalmente armazenada na vesícula biliar, até que necessitada no duodeno. A secreção total diária da bile é de cerca de 600 a 1000 mL e o volume máximo da vesícula biliar é de apenas 40 a 70 mL. Não obstante, a secreção biliar de até 12 horas pode ser armazenada na vesícula biliar, porque a água, o sódio e o cloro e a maior parte dos pequenos eletrólitos são continuamente absorvidos pela mucosa da vesícula biliar, concentrando os outros constituintes biliares, incluindo os sais biliares, o colesterol e a bilirrubina. A maior parte dessa absorção é efetuada pelo transporte ativo do sódio através do epitélio da vesícula biliar. A bile normalmente é concentrada cerca de cinco vezes, porém pode ser concentrada até o máximo de 12 a 18 vezes (GUYTON, 1996), porém nas espécies bovina, caprina e ovina não ocorre concentração (GÜTLER et al., 1979).

Duas condições básicas são necessárias ao esvaziamento da vesícula biliar: o esfíncter de Oddi precisa relaxar para permitir que a bile flua do ducto biliar comum para o interior do duodeno e a própria vesícula biliar precisa contrair-se por estímulo do parassimpático, para proporcionar a força necessária à movimentação da bile pelo ducto comum. Quando a gordura não está presente na refeição, a vesícula

esvazia-se deficientemente; porém em presença de quantidades suficientes de gordura, a vesícula esvazia-se totalmente, em cerca de uma hora (GUYTON, 1996; GÜTLER et al., 1979).

Muitos mamíferos, como o equino e pássaros não possuem vesícula biliar e até comumente como tratamento para cálculos biliares, colicistite aguda ou crônica e tumores no canal biliar em humanos, o órgão é removido cirurgicamente, processo denominado colecistectomia laparoscópica, e que não implica em má digestão ou má absorção de gordura. A vesícula simplesmente facilita o armazenamento da bile (BEGLEY et al., 2005; JONES, 2000; MANUAL MERCK, 2004).

2.2. COMPOSIÇÃO DA BILE

A bile é uma solução aquosa amarela-esverdeada constituída de compostos orgânicos e inorgânicos, onde os maiores constituintes são: ácidos biliares, colesterol, fosfolipídeos (principalmente fosfatidilcolina) e o pigmento biliverdina. Imunoglobulina A e muco são secretados dentro da bile e previnem o crescimento bacteriano e sua adesão, e a presença de tocoferol pode prevenir dano oxidativo no epitélio da vesícula biliar e intestino delgado. Muitas substâncias endógenas (endobióticas) podem ser secretadas na bile e resistirem à circulação entero-hepática, estas incluem: vitaminas lipossolúveis (principalmente a forma biologicamente ativa da vitamina D₂), vitaminas hidrossolúveis (particularmente vitamina B₁₂, ácido fólico e pirodoxina), estrógenos esteroidais, progesterona, testosterona, corticosteróides e traços de metais essenciais (CAREY; DUANE, 1994). Muitas substâncias exógenas (xenobióticos) ingeridas são também excretadas na bile e passam em algumas etapas da circulação entero-hepática, a exemplo, agentes antimicrobianos: clindamicina, rifampicina e eritromicina. E também fármacos usados comumente como morfina. A bile é geralmente isotônica tendo o plasma uma osmolaridade de aproximadamente 300 miliosmoles por kilo (mOsm/Kg) (ERLINGER, 1994) e nos humanos apresenta um potencial hidrogeniônico (pH) em torno de sete a oito (BEGLEY et al., 2005).

A composição da bile hepática é diferente da bile vesicular (TABELA 1). No processo de concentração da bile, a água e grandes porções de eletrólitos são reabsorvidos pela mucosa da vesícula, porém praticamente todos os outros

constituintes, incluindo principalmente os sais biliares e as substâncias lipídicas, colesterol e lecitina não são reabsorvidos e, por conseguinte, tornam-se altamente concentrados na bile da vesícula biliar (GUYTON, 1996; HARPER et al., 1982).

TABELA 1. Composição da bile

	Bile do fígado	Bile da vesícula biliar
Água	97,5 g%	92 g%
Sais biliares	1,1 g%	6 g%
Bilirrubina	0,04 g%	0,3 g%
Colesterol	0,1 g%	0,3 a 0,9 g%
Ácidos graxos	0,12 g%	0,3 a 0,12 g%
Lecitina	0,04 g%	0,3 g%
Sódio	145 mEq/l	130 mEq/l
Potássio	5 mEq/l	12 mEq/l
Ca ⁺	5 mEq/l	23 mEq/l
Cl ⁻	100 mEq/l	25 mEq/l
HCO ₃ ⁻	28 mEq/l	10 mEq/l

Fonte: Guyton, 1996

2.3 OS SAIS BILIARES E SUA FUNÇÃO

As células hepáticas formam cerca de 0,5 g de sais biliares diariamente. O precursor dos sais biliares é o colesterol que é fornecido seja pela dieta ou sintetizado pelas células hepáticas, no decurso do metabolismo lipídico e, a seguir, convertido em ácido cólico ou ácido quenodesoxicólico em quantidades aproximadamente iguais por processos multienzimáticos. A biotransformação inclui clivagem oxidativa da cadeia lateral de colesterol resultando na conversão de uma parte do isoctano (cadeia lateral com oito carbonos) em ácido isopentanóico (cadeia lateral com cinco carbonos) e adição de grupo hidroxil no núcleo. O ácido cólico ou ácido quenedoxicólico combinam-se, então, através de ligação amida, principalmente com a glicina e, em menor extensão, com a taurina para formar ácidos glico e tauro conjugados. Os sais desses ácidos são secretados na bile (GUYTON, 1996).

Considera-se que os ácidos biliares primários encontram-se como ésteres da Co-A dentro do hepatócito, isto é, colil- ou quenodesoxicolil-CoA. Os derivados de Co-A são formados com a ajuda de uma enzima ativadora que só existe nos microsomas hepáticos. Uma segunda enzima catalisa a conjugação dos ácidos

biliares ativados (derivados de Co-A), com a glicina ou taurina, para formar os ácidos glicólico ou glicoquenodesoxicólico e taurocólico ou tauroquenodesoxicólico. No homem, a relação entre conjugados da glicina e taurina é normalmente de 3:1. Uma vez que a bile contém quantidades significantes de cátions alcalinos, considera-se que os ácidos biliares e seus conjugados estão na realidade na forma de sais, daí o termo “sais biliares”, muitas vezes usado para descrever esses compostos na bile (BEGLEY et al., 2005; HARPER et al., 1982).

Muitos microrganismos presentes no intestino realizam a desconjugação dos ácidos biliares, geralmente possuem enzimas capazes de hidrolisar conjugados de taurina e glicina. O primeiro isolamento de bactérias capazes de hidrólise dos ácidos biliares conjugados foi realizado por Frankel em 1936. Desde então, há muitos relatos de microrganismos com potencial ação em ácidos biliares.

Os ácidos biliares desempenham importantes funções na digestão, como emulsificação e solubilização de gorduras e também a absorção dos ácidos graxos, dos monoglicerídeos e do colesterol, bem como de outros lipídeos, pelo aparelho intestinal. O ácido biliar é secretado dentro da bile e formam micelas mistas contendo fosfatidilcolina e colesterol. Quando a bile chega ao intestino delgado a fosfatidilcolina é hidrolisada e absorvida e o colesterol precipitado na solução contribui para aumentar a sua eliminação. A natureza anfipática do ácido biliar permite sua ação detergente nas partículas de gordura da dieta, o que leva à quebra do glóbulo de gordura ou emulsificação em gotículas microscópicas (HOFMANN, 1999). A emulsificação aumenta a área de superfície da gordura, disponibilizando-a para a ação das lipases, que não possuem acesso ao interior da gotícula.

Os sais biliares também funcionam como “carreador de lipídeos” que são solubilizados formando micelas carregadas em meio aquoso. As micelas são altamente solúveis, devido a cargas elétricas dos sais biliares. Os lipídeos são “carreados” dessa forma para a mucosa, onde são, então, absorvidos. O meio aquoso é crítico para a absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis (HOFMANN, 1994). Quando as gorduras não são adequadamente absorvidas, as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K não são também absorvidas satisfatoriamente. Ainda que grandes quantidades das três primeiras dessas vitaminas sejam habitualmente armazenadas no organismo, isso não ocorre com a vitamina K. Dentro de poucos dias após a suspensão da secreção biliar ocorre, geralmente, uma deficiência de vitamina K. Isso, por sua vez, resulta na deficiente formação pelo fígado, de vários

fatores da coagulação sangüínea, como protrombina e fatores VII, IX e X, resultando, assim, em grave deficiência da coagulação sangüínea (GUYTON, 1996).

Além de sua função na digestão, a bile é um reservatório de álcali que ajuda a neutralizar o quimo ácido proveniente do estômago. A bile ainda é um veículo importante de excreção, remove muitos medicamentos, toxinas, pigmentos biliares e diversas substâncias inorgânicas como o cobre, zinco e mercúrio (HARPER et al., 1982).

Em adição, é confirmado que a habilidade dos ácidos biliares em agir como detergente também permite interações com membranas lipídicas de bactérias conferindo assim uma propriedade antimicrobiana (BEGLEY et al., 2005).

A deficiência congênita ou adquirida na síntese do ácido biliar ou em seu transporte resulta em uma alta concentração intracelular. Esta condição pode induzir necroses e apoptoses, ocorrendo danos ou morte do hepatócito (POWELL, 2001). Extracelularmente, a alta concentração induz a secreção de eletrólitos e água, manifestando clinicamente em diarreia (HOFMANN, 1999). Por outro lado, o decréscimo na concentração de ácido biliar no intestino pode resultar em obstrução da circulação hepática, má absorção intestinal e incompleta solubilização micelar dos lipídeos da dieta acarretando em má absorção de gorduras. Decréscimos na concentração dos ácidos biliares na vesícula biliar torna a bile supersaturada levando à precipitação do colesterol, originando os cálculos biliares que são estruturas cristalinas formadas por concreção ou agregação de colesterol monohidratado e mistura de sais de cálcio, ácido biliar, pigmentos biliares, proteínas, ácidos graxos e fosfolipídeos. Finalmente, alguns dos ácidos biliares secundários gerados por microrganismos são potencialmente tóxicos e mutagênicos, que modificam a microbiota do intestino conduzindo a diarreia, inflamação da mucosa e ativam fármacos nocivos e carcinogênicos no conteúdo intestinal (SALMINEN, 1996).

O líquido biliar possui diversas funções comercialmente. A bile pode ser utilizada com fins terapêuticos, mas para este intuito deve ser depurada, dessecada ("ox bile extract"), obtida mediante purificação do líquido biliar com etanol para desodorização e descoloração e/ou mediante evaporação a seco (CEE, 2003). Segundo Procópio Filho (2007) a bile também pode ser comercializada para colorir seda pura e para a fabricação de medicamentos e possui mercado assegurado na China, Japão, Suíça, Alemanha e Itália. Outra função terapêutica do líquido biliar foi

descrita por Vital Brazil em 1902, onde constatou que a bile de diversos animais, inclusive a de bovinos, destrói “in vitro” o veneno de serpentes em quantidades próximas da dose limite mortal. Os venenos de serpentes, como também certas toxinas microbianas, a tetânica, postos em contato durante 24 horas com certa quantidade de bile fresca perdem sua toxidez e não produzem nenhum efeito prejudicial quando injetada a mistura nos animais, o resultado é a ação digestiva da bile sobre o veneno.

2.4 CIRCULAÇÃO ENTERO-HEPÁTICA DOS SAIS BILIARES

Uma porção dos ácidos biliares pode sofrer alterações posteriores, no intestino, pela atividade de certas bactérias intestinais, como a desconjugação e 7α -desidroxilação, o que produz os ácidos biliares secundários, desoxicólico, a partir do ácido cólico, e litocólico, um derivado 7,12-desidroxilado do ácido cólico. Embora os produtos da digestão dos lipídeos sejam normalmente absorvidos nos primeiros 100 cm de intestino delgado, os ácidos biliares conjugados e desconjugados são absorvidos quase exclusivamente no íleo, onde existe um sistema específico de transporte, tanto para os ácidos biliares conjugados como para os desconjugados. Uma vez que os ácidos biliares fecais resultam principalmente como produtos do metabolismo bacteriano, considera-se que o metabolismo dentro da luz do intestino, com reabsorção subsequente por difusão passiva, é um componente da circulação entero-hepática. Esse processo serve para retornar ao fígado, quantitativamente quase 90% dos ácidos biliares secretados no intestino. Entretanto, o ácido litocólico (ácido cólico 7,12 desidroxilado), um ácido biliar secundário, devido a sua insolubilidade, não é totalmente reabsorvido (HARPER et al., 1982).

Uma pequena fração dos sais biliares, talvez somente 500 mg/dia não é reabsorvida, sendo portanto eliminada nas fezes. Apesar de ser esta uma pequena fração, representa um percurso importante de eliminação do colesterol. A circulação entero-hepática dos sais biliares (FIGURA 2) é tão eficiente que, cada dia, o reservatório relativamente reduzido de ácidos biliares (cerca de 3-5 g) pode ser recirculado pelo intestino seis a dez vezes, com apenas uma pequena perda nas fezes (HARPER et al, 1982). Segundo Guyton, pode recircular em até 18 vezes. Todavia, conforme Harper et al. (1982), a cada dia, uma quantidade de ácidos

biliares equivalente à perda nas fezes, é produzida a partir do colesterol pelo fígado de modo que o reservatório de ácidos biliares é mantido no mesmo valor, isso é efetuado graças a um sistema de controle por retroação.

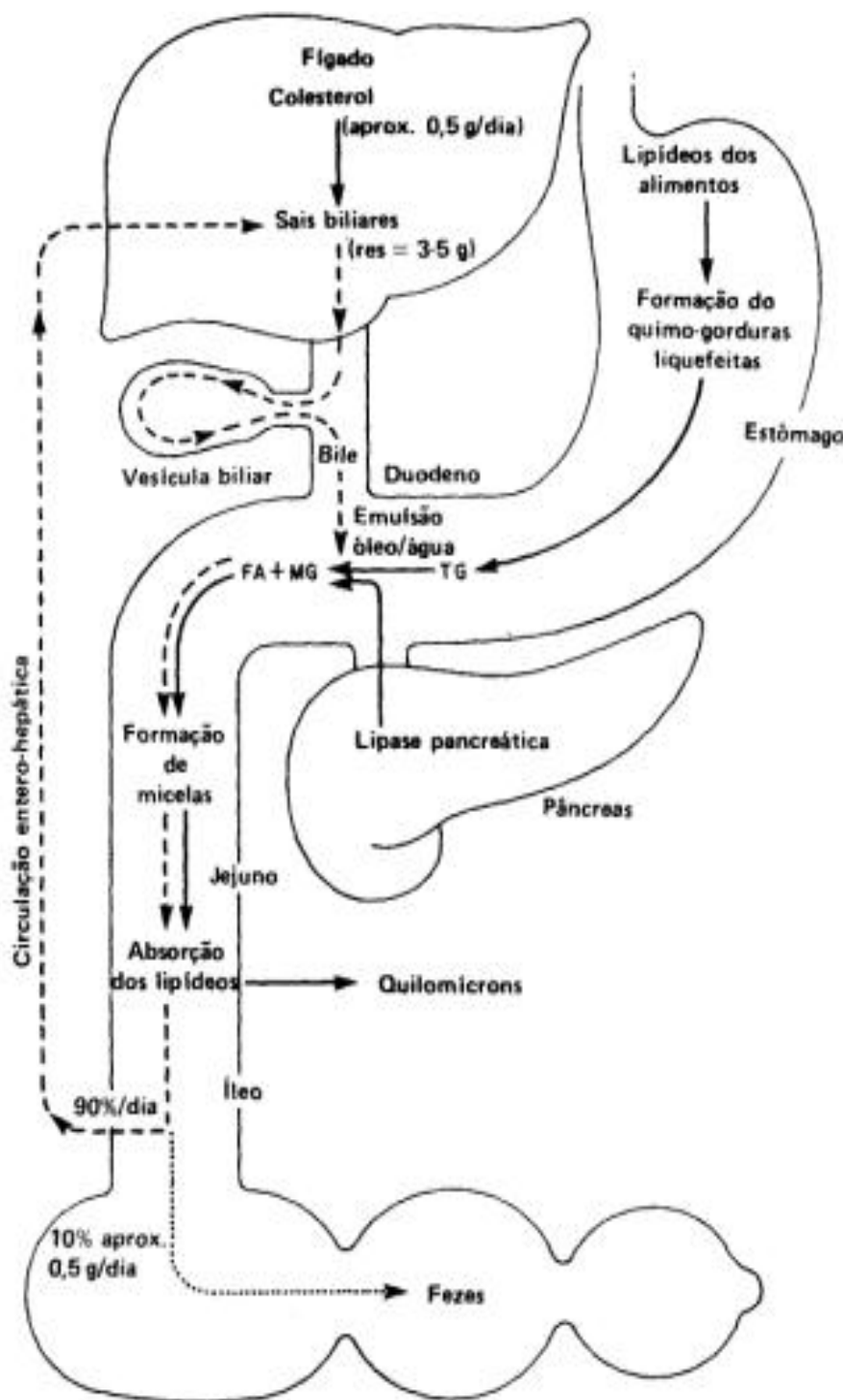


FIGURA 2 . Circulação entero-hepática dos sais biliares e digestão dos lipídeos. Linhas tracejadas indicam a circulação entero-hepática dos sais biliares. TG: triacilglicerol; MG : monoacilglicerol; FA: ácidos graxos de cadeia longa.

Fonte: HARPER et al., 1982

2.5 PRESENÇA DE BACTÉRIAS NA VESÍCULA BILIAR

Para comprovar a permanência de bactérias na vesícula biliar, Stoffregen et al. (2004) realizaram infecção experimental no referido órgão de 13 bezerros com *E.coli* O157:H7. Mesmo com o tratamento de dexametasona (0,25 mg/kg, IV) durante cinco dias (três antes, no dia e um dia após a inoculação), cinco bezerros apresentaram a bactéria aderida no epitélio da vesícula, sugerindo a inclusão desta nas amostras de culturas de *E. coli* como auxílio para identificar bovinos infectados em frigoríficos. Os mesmos autores afirmaram que a bactéria pode ocasionar a ocorrência de contaminação do fígado do referido animal e a incidência de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) em humanos. Contrepois et al. (1986) e Jeong et al. (2006) também ao realizarem infecções experimentais em bezerros com *E. coli* encontraram a bactéria na vesícula biliar dos bovinos.

Em pequenos ruminantes, *Salmonella* spp. foi isolada da vesícula biliar de 24 caprinos, em um frigorífico com 35 caprinos positivos para *Salmonella* spp. (CHANDRA et al., 2005). *Campylobacter jejuni* também foi isolado em vesícula biliar de ovinos (ERTAS et al., 2003; RAJI, et al., 2000).

Pesquisas com humanos aparentemente saudáveis demonstraram a existência de bactérias patogênicas na vesícula biliar. Paelke et al. (1989) em exame bacteriológico do fluido e do epitélio de 262 vesículas biliares aleatoriamente selecionadas obtiveram como resultado bactérias presentes em 31,7% dos casos (8,2% presente no fluido e 23,5% no epitélio). As bactérias encontradas foram: *Enterobacteriaceae* (46,9%), *Pseudomonas* spp. (26,2%), cocos Gram positivos (14,8%) e *Clostridium* spp. (6,2%). Hancke et al. (1986) também descreveram maior frequência de microrganismos isolados no epitélio da vesícula.

Kosowski et al. (2000) afirmaram a correlação de inflamação do ducto biliar com a aderência de *E. coli* no epitélio vesical de humanos e Condon et al. (1986) relataram colonização de *Enterobacteriaceae* em vesículas com alterações fisiológicas. Entretanto, Andrews e Henry (1935), Edlund et al. (1959), Flemming et al. (1967), Mason (1968), Osler (1907), Sakurai et al. (1992) e Watson (1969) descreveram a ocorrência de inflamação no epitélio vesical e ausência de bactérias na bile.

Proulty et al. (2002) relataram que em humanos com cálculos vesiculares,

ocorre a formação de biofilme por *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Typhimurium na vesícula biliar. Com a formação de biofilme a bactéria permanece protegida da alta concentração da bile. E segundo Cloete (2003), uma questão importante referente ao biofilme, é o aparecimento de infecções recorrentes devido a presença de estirpes resistentes presentes nesta população.

A *Salmonella* Typhi, agente da febre tifóide, tem a capacidade de estabelecer uma infecção crônica assintomática na vesícula biliar dos indivíduos após uma aguda infecção (PANDEY et al., 1995). Esta bactéria está relacionada com o aumento da incidência de doenças hepatobiliares, e apresenta um risco seis vezes maior para o desenvolvimento de câncer hepatobiliar (MELLEMGAAARD et al., 1988). Shukla et al. (2000) afirmam um risco de 8,47 maior para portadores assintomáticos de *Salmonella* Typhi desenvolverem câncer na vesícula biliar em relação aos não portadores.

O gênero *Salmonella* é altamente resistente à bile, com “Minimal Bactericidal Concentration” (MBC) entre 30 e 60%. Deste modo a bactéria possui a habilidade de colonizar a vesícula biliar e caracterizar o estado de portador assintomático em 3-5% das pessoas infectadas (VAN VELKINBURGH; GUNN, 2002).

Varaldo et al. (1984) isolaram 3.226 estafilococos durante seis meses em diferentes unidades hospitalares na Itália, sendo que 604 isolados estavam presentes no líquido biliar e trato genital de humanos. Segundo Garcia-Lechuz et al. (2003), Merchant e Falsey (2002) e Petakovic et al. (2002) pacientes com colecistite apresentaram estirpes estafilocócicas no líquido biliar e também Hageman et al. (2001) isolaram estafilococos da bile de pacientes com complicada colecistectomia. Kawecky et al. (2007) afirmaram que normalmente há cultura positiva de estafilococos na bile de pacientes submetidos a transplantes de fígado.

Conger (2004) afirma que a vesícula biliar é um importante nicho bacteriológico. Algumas bactérias, como a *Listeria* spp., escapam do sistema imunológico e da ação de antibióticos ao se alojar na vesícula biliar, isto porque esta oferece resistência à entrada destes mecanismos de defesa. Somando-se a este fato, a bactéria possui um grupo de genes que permite sua multiplicação e crescimento dentro da vesícula sem causar sintomas no hospedeiro. A higiene deficiente pode espalhar a bactéria excretada para as mãos e contaminar alimentos.

Segundo Correia (2001), o ácido biliar deprime a resposta humoral. O efeito resulta na inibição da proliferação de células e em menor extensão na exocitose de imunoglobulinas. No estudo, o ácido quenodeoxicólico inibiu a produção de IgM induzida por *S. aureus*, também IgG foi inibida, mas a IgA não foi modificada, demonstrando ser a IgM mais sensível ao efeito do ácido. A bile inibe a proliferação de linfócitos que é o regulador da secreção de IgM.

A problemática da presença de bactérias na vesícula biliar é devido à técnica utilizada atualmente para o abate de bovinos, pois segundo a legislação vigente (BRASIL, 1971), no exame *post mortem* do fígado de bovinos, a vesícula biliar é comprimida, podendo ser incisada, se necessário. Esta prática leva ao derramamento da bile sobre o fígado. Em abatedouros de bovino é muito comum presenciar bile na mesa de exame do fígado, principalmente porque os funcionários são treinados a palpar vesículas e cortá-las caso haja cálculo biliar, chamado de “pedra”. A garantia de qualidade microbiológica para o fígado bovino é de fundamental importância, pois a víscera é comercializada a preços populares, permitindo o consumo da população de classe mais baixa. Sem contar seu excelente valor nutricional. Segundo Cotran et al. (1996) dentre as formas de ferro heme e ferro não-heme, sabe-se que o ferro presente em carnes (heme), principalmente em fígado bovino, é mais disponível biologicamente, podendo ser assimilado na proporção de aproximadamente 25% do total de alimento. O ferro é um elemento essencial para os processos metabólicos, como transporte de oxigênio, metabolismo oxidativo e crescimento celular.

Martini (2002) verificou a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A (a vitamina A melhora a absorção de ferro na dieta) em alimentos: feijão comum, fígado bovino, cenoura e combinações com medicamentos: Fer-In-Sol[®], Arovit[®] e Neutrofen[®]. As amostras contendo fígado bovino apresentaram as maiores concentrações de fração cinza, extrato etéreo, proteína, vitamina A, ferro heme e quantidade de ferro disponível.

2.6 AÇÃO ANTIMICROBIANA DA BILE

Conceitualmente os sais biliares são utilizados na microbiologia em meio seletivo para promover o crescimento de um tipo particular de microrganismo e inibir

possível microbiota acompanhante. No meio “Violet Red Bile Glucose” (VRBG), um meio seletivo, e assim como no Ágar MacConkey, dois meios seletivos/diferenciais, os sais biliares atuam inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas e favorecendo o desenvolvimento de bactérias Gram negativas (MERCK, 2000; PELCZAR, et al., 1997).

Segundo pesquisa realizada por Herold et al. (1999), os sais biliares podem ser utilizados como microbicidas tópicos para a prevenção de doenças sexualmente transmissíveis. Possuem notável efeito contra *Neisseria gonorrhoeae*, “Human Immunodeficiency Vírus” (HIV) e herpes vírus. O estudo sugere que o ácido taurolitocólico 3-sulfato sozinho ou combinado com ácido glicocólico exibem excelente atividade “in vitro” contra os referidos patógenos com pouco ou nenhuma citotoxicidade às células epiteliais cervicais humanas.

Muitos fatores determinam a exata ação da bile nas membranas celulares de microrganismos. A concentração da bile é um desses fatores. Sais biliares altamente concentrados podem dissolver a membrana lipídica e causar a dissociação das proteínas integrais da membrana, resultando em vazamento do conteúdo celular e morte das células. A concentração da bile é um desses fatores. (HEUMAN et al., 1996; NOH; GILLILAND, 1993). Sais biliares pouco concentrados afetam as propriedades físico-químicas na superfície da célula, como a hidrofobicidade (WAAR et al., 2002).

A ligação dos ácidos biliares na membrana lipídica correlaciona-se com sua hidrofobicidade. Ácidos biliares conjugados são ácidos fortes e completamente ionizados no pH fisiológico, permanecendo no exterior da vesícula até que haja transporte disponível. Ácidos biliares inconjugados são passivelmente cruzados pelo movimento “flip-flop” do lipídeo na membrana da vesícula biliar e, assim, entram na célula. A velocidade do “flip-flop” depende do número de grupos hidróxi. Ácido di-hidróxi biliar move-se rapidamente, enquanto que o ácido tri-hidróxi biliar se move mais lentamente (CABRAL et al., 1987). A bile bovina contém sais biliares tri-hidróxi conjugados, sendo menos inibitório que a bile suína, que contém sais biliares di-hidróxi conjugados. Embora a bile bovina seja comumente escolhida para avaliar a tolerância de estirpes bacterianas “in vitro”, a mais similar à bile humana é a bile suína, com relação a sais biliares/colesterol, fosfolipídeos/colesterol e a proporção glicina/taurina (LEGRAND-DEFRETIN et al., 1991).

Finalmente a arquitetura e composição da membrana desempenham um papel chave em sua resistência à bile, como carga elétrica, hidrofobicidade e fluidez do lipídeo; e alterações podem ter consequências significantes. Conformação e injúria estrutural das membranas celulares lipopolissacarídeas causadas por congelação aumentam a susceptibilidade de células de *E. coli* O157: H7 para sais biliares (CHOU ; CHENG, 2000).

Mudanças na composição de ácidos graxos também afetam a tolerância à bile. Fernandez Murga et al. (1999) demonstraram que *Lactobacillus acidophilus* que cresciam na temperatura de 25°C eram mais resistentes à bile que células que cresciam a 37°C. Os autores concluíram que ácidos graxos perdem a insaturação quando ocorre aumento de temperatura, aumentando a estabilidade da membrana lipídica.

É observado que a tolerância das estirpes bacterianas em sistema de caldo biliar pode não refletir a mesma habilidade que estas possuem à bile. Outra dificuldade encontrada é reproduzir exatamente as condições “in vivo” em um ambiente laboratorial onde nem todos os parâmetros que afetam a sobrevivência das bactérias são avaliados. Exposição a diversas faixas de pH, temperaturas, atmosfera de crescimento podem insensibilizar a bactéria aos efeitos da bile ou alternativamente, aumentar sua susceptibilidade. Níveis de ácidos biliares no intestino não são constantes, são relativamente baixos até a ingestão de refeições com gordura. A pré-exposição do microrganismo a estes baixos níveis, confere adaptação a níveis mais altos (BEGLEY et al., 2005). Segundo Begley et al. (2002) após a exposição de *Listeria monocytogenes* a 0,08% de ácidos biliares no tempo de cinco segundos, resultou na sobrevivência de 37% destes organismos e adaptação à dose letal, onde a concentração da bile era de 0,3% no tempo de 15 segundos.

A presença de alimento no intestino influi na sobrevivência das bactérias, pois formam matrizes e/ou podem se ligar aos ácidos biliares, prevenindo o ambiente da ação tóxica da bile (BEGLEY et al., 2005). Gänzle et al. (1999) observaram que *Lactobacillus curvatus* são rapidamente inativados por bile suína no intestino delgado. No entanto, ao adicionar alimento é constatado um efeito protetor e resulta no aumento de bactérias no compartimento do intestino. Shimakawa et al. (2003) afirmaram que a inibição de *Bifidobacterium breve* (presente no Yakult) pela bile é parcialmente suavizada pela adição de proteínas de soja, pois os ácidos biliares se

ligam e agregam-se. Em vivo, a atividade antibacteriana da bile pode ser mais baixa que a observada em caldo biliar, uma vez que os sais biliares podem estar complexados em micelas com fosfolipídeos e não estarem livres para interagir com a bactéria (BEGLEY et al., 2005) .

Há vasta informação relativa ao mecanismo molecular empregado pela bactéria para se adaptar e resistir fisiologicamente ao estresse, como por exemplo, o baixo pH do estômago e a elevada osmolaridade do trato gastrointestinal. Em contraste, a genética bacteriana de resistência à bile é pouco compreendida, particularmente em microrganismos Gram positivos. Torna-se complicada a natureza deste estresse, pois a habilidade de um organismo tolerar a bile envolve proteínas, genes e enzimas que expulsam a bile, ou que modificam e transformam os sais biliares (BEGLEY et al., 2005).

2.7 MECANISMOS ADAPTATIVOS DOS MICRORGANISMOS PARA SOBREVIVEREM À AÇÃO DA BILE

Bactérias entéricas possuem resposta à bile por alterar a produção de proteínas e assim, desenvolvem maior resistência (GUNN, 2000). O sucesso desses microrganismos na colonização da vesícula biliar se deve ao desenvolvimento de diversos mecanismos moleculares como a presença de uma barreira à ação detergente da bile em sua membrana externa, conferida pela síntese de um lipopolissacarídeo (LPS), conforme descrito por Picken e Beachmam (1977), mediado por um limitado número de genes, como: *acrAB* (MA. et al., 1994; NIKAIDO et al., 1998), *phoPQ* (VAN VELKINBURGH; GUNN, 1999) , *tolR* (PROUTY et al., 2002) e *wec* (RAMOS-MORALES et al., 2003) entre outros ainda não completamente esclarecidos. O efeito da bile sobre bactérias entéricas Gram positivas não é bem compreendido, mas alguns mecanismos encontrados em Gram negativas são também encontrados em Gram positivas (GUNN, 2000). Ohtomo et al. (1981) demonstraram que a taurina foi detectada no material capsular produzido por estirpes de *S. aureus* e Liau e Hash (1977) afirmaram que a taurina é um dos componentes da superfície polissacarídea do antígeno “Surface Polysaccharide Antigen” (SPA) em *S. aureus*.

2.7.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

Além do peptidoglicano, bactérias Gram negativas contêm uma camada adicional de parede, composta por LPS. Essa camada corresponde a uma segunda bicamada lipídica, diferenciando-se da membrana citoplasmática por apresentar, além dos fosfolípidos, polissacarídeos e proteínas. Os lípidos e polissacarídeos encontram-se intimamente associados na camada externa da membrana externa, formando estruturas lipopolissacarídeas, e devido a essa característica a membrana externa é denominada camada lipopolissacarídea, ou simplesmente LPS (MADIGAN et al., 2004).

Embora complexa, a química do LPS de várias bactérias é atualmente bastante conhecida. O lipopolissacarídeo consiste em duas porções: o polissacarídeo interior e o polissacarídeo "O" (FIGURA 3). No gênero *Salmonella*, o polissacarídeo interno consiste em cetodesoxioctonato (CDO), açúcares contendo sete carbonos (heptoses), glicose, galactose e N-acetilglicosamina. O polissacarídeo "O" encontra-se associado ao polissacarídeo interno, e contém galactose, ramnose e manose (todos açúcares de seis carbonos), além de um ou mais dideoxi-açúcares pouco usuais como abequose, tivelose, paratose ou colitose. Estes açúcares se associam, formando seqüências de cinco ou seis membros, geralmente exibindo ramificações. A grande molécula de polissacarídeo "O" é formada pela repetição dessas seqüências. A porção lipídica do lipopolissacarídeo é denominada lípido "A", apresentando ácidos graxos unidos a um dissacarídeo composto por N-acetilglicosamina fosfato por meio de uma ligação do tipo éster amina. O dissacarídeo liga-se ao polissacarídeo interno pelo CDO. Os ácidos graxos comumente encontrados no lípido "A" incluem os ácidos capróico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico (MADIGAN et al., 2004).

Embora a principal função da membrana externa seja estrutural, também é tóxica aos animais. Estudos empregando frações do lipopolissacarídeo indicam que a fração lipídica, especificamente o lípido "A", é reponsável pela toxicidade, exercendo atividade de endotoxina, e a fração polissacarídica torna o complexo solúvel em água e imunogênico (MADIGAN et al., 2004).

O LPS confere ao microrganismo maior resistência a bile, enquanto a porção do lípido "A" ancora-se na membrana, o antígeno "O" protrai da superfície da mem-

brana e produz uma maior barreira para compostos externos. A perda do antígeno “O” ocasiona uma colônia fenotípica rugosa, resultando em decréscimo de resistência à bile (PICKEN; BEACHMAM, 1977).

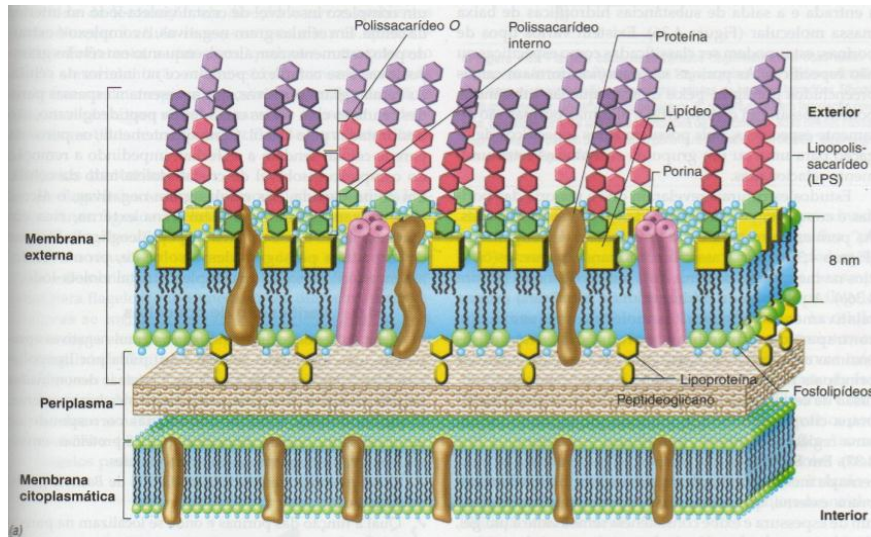


FIGURA 3. Parede celular de bactérias Gram negativa. Arranjo do lipopolissacarídeo
Fonte: MADIGAN et al., 2004.

2.7.2 Bomba de efluxo

O efluxo de sais biliares do citoplasma bacteriano diretamente para o exterior da célula é o melhor mecanismo caracterizado de resistência ao líquido biliar. Os sistemas de efluxo são reponsáveis por resistência bacteriana a diversos compostos, incluindo antimicrobianos, agentes oxidativos, solventes orgânicos e sais biliares. O conhecimento desse mecanismo foi relatado pela primeira vez por Levy em 1992. Este sistema é codificado por um gene: “efflux pump across membrane” (*acrAB*) (MA et al., 1994; NIKAIDO et al., 1998) sendo necessário para a intrínseca resistência de *E. coli* a solventes, detergentes, antibióticos lipofílicos e sais biliares. Quando o gene *acrAB* (FIGURA 4) é expressado, *E. coli* torna-se resistente a fármacos como cloranfenicol e tetraciclina. A expressão pode ser mediada pelo “operon” “multiple antibiotic resistant” (*marAB*) (OKUSU et al., 1996). *AcrB* é uma força-dependente de prótons para transporte de drogas por efluxo e *acrA* auxilia o efluxo do citoplasma para o meio por transpor interna e externamente a membrana. A referida bactéria também apresenta um outro sistema de efluxo codificado pelo gene “efflux multidrug” (*emrAB*) que é também envolvido na expulsão de sais biliares

do citoplasma da célula e utiliza esse mesmo sistema para a resistência à multifármacos (FRALICK, 1996). Numerosas bactérias, incluindo *Salmonella Typhimurium* (NIKAIDO et al., 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (LI et al., 1994), *Haemophilus influenzae* (SANCHES et al., 1997), *Neisseria gonorrhoeae* (MAIER et al., 1975) e *Vibrio cholerae* (COLMER et al., 1998) possuem similar sistema de efluxo.

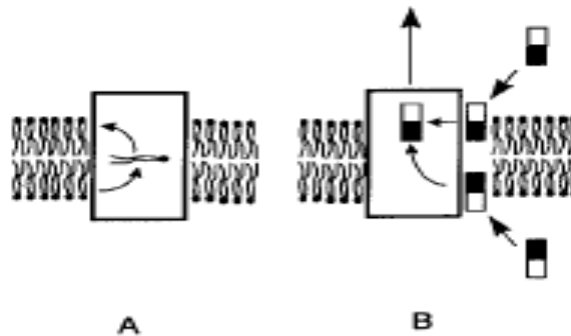


FIGURA 4. Mecanismo hipotético da bomba de efluxo. (A) Movimento de “flip-flop” do lipídeo na membrana. (B) A atividade de bomba de efluxo da proteína expressa pelo gene *acrAB* que captura o substrato no lado interno e externo da membrana.

Fonte: NIKAIDO et al., 1998.

Como este ativo transporte envolve uma baixa susceptibilidade e resistência cruzada a diversas classes de fármacos e ainda amplifica esta característica para outros microrganismos, há promissores estudos objetivando inibir este mecanismo e assim aumentar a concentração intracelular de antimicrobianos que são expelidos por bomba de efluxo, restaurando deste modo a eficiência do antimicrobiano frente a estirpes clinicamente resistentes e reduzindo a capacidade do microrganismo para aquisição de adicional resistência (MAHAMOUD et al., 2007).

2.7.3 Expressão de genes que conferem resistência bacteriana à bile

Apenas um limitado número de genes são conhecidos na contribuição de resistência bacteriana à bile, como o *phoPQ*, *tolR* e *wec* entre outros. “Phosphorylated” (PhoP) regula a expressão de vários genes no citoplasma, e este, é ativado pela fosforilação do *PhoQ*, uma proteína da membrana interna que recepta sinais do exterior da célula. Este sistema é envolvido em resistência ao baixo pH e peptídeos catiônicos antimicrobianos. Resistência a estes peptídeos dependem da modificação no lipídeo “A” da membrana externa, que reduz a permeabilidade

não apenas à adenosina monofosfato cíclica (cAMP), mas também aos componentes da bile (VAN VELKINBURGH; GUNN, 1999). O gene “tolerance” (*tol*) regula proteínas com a função de manter a integridade da membrana externa, também serve como receptor para certos fagos (CHAI; FOULDS, 1977). Determinadas proteínas são responsáveis pela síntese de um Antígeno Enterobacteriano Comum (ECA), um glicolípido diferente do LPS também presente na membrana externa de todas as espécies da família *Enterobacteriaceae* e que contribui para a virulência das salmonelas por proteger o patógeno dos sais biliares (RAMOS-MORALES et al., 2003).

A *Salmonella* Typhimurium utiliza a bile como sinalizador para regular sua capacidade invasiva no lúmen intestinal, altas concentrações da bile diminui a transcrição de patogenicidade, o “*Salmonella* Pathogenicity Island 1 Typhimurium Type III Secretion System” (SPI-1 TTSS) é o gene envolvido na invasão da bactéria à célula epitelial. A invasão pode iniciar quando a concentração da bile está baixa, logo após o trânsito da camada de muco que reveste o epitélio no íleo distal (PROUTY et al., 2004).

Contrariamente ao efeito negativo da bile na patogenicidade de salmonelas, Poppe et al. (1995) afirmaram que o crescimento de *Shigella* spp. em sais biliares resulta em um aumento de secreção da proteína “Integral protein adherence” (*Ipa*) proporcionando à bactéria maior aderência nas células epiteliais do lúmen intestinal. *Vibrio cholerae* em resposta aos ácidos biliares formam biofilme. O gene responsável por esta formação é o “vibrio polysaccharide synthesis” (*vps*). A expressão do gene *vps* codifica genes que sintetizam um exopolissacarídeo (EPS), matriz que estabiliza o desenvolvimento do biofilme (HUNG, et al. 2006).

Estirpes de *E. coli* além de envolver o LPS e a bomba de efluxo como mecanismos de resistência à bile, ainda expressam proteínas “protein membrane outer” (*OmpC*) que são responsáveis por um canal com poros de menor diâmetro e menos susceptível ao efeito inibitório do deoxicolato que outras estirpes que expressam *OmpF*, canal com maior diâmetro na membrana (THANASSI et al., 1997).

Em *Enterococcus faecalis* ocorre aumento de produção de 45 proteínas durante o tratamento com sais biliares, sendo sete dessas proteínas, induzidas por condição de severo estresse. Três são identificadas como “chaperones” moleculares (*DnaK*, *GroEL* e *Ohr*) resistentes a hidroperóxidos orgânicos (BEGLEY et al., 2005).

“Chaperones” moleculares auxiliam a síntese de proteínas para que estas tenham um correto enovelamento.

Bactérias como *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. e *Bacterioides* spp. têm desenvolvido mecanismos para resistirem à ação detergente da bile envolvendo a habilidade em transformar sais biliares bioquimicamente. A “Bile Salt Hydrolase” (BSH) é uma enzima codificada pelo gene *bsh* que catalisa a hidrólise de glicina e/ou taurina conjugada nos sais biliares em aminoácido residual e sais biliares livres (BEGLEY et al., 2006). A função da enzima BSH microbiana ainda não é bem compreendida. Segundo Begley et al. (2005) as enzimas hidrolases facilitam a incorporação de colesterol e bile na membrana bacteriana. A incorporação pode aumentar a força tênsil da membrana ou alterar sua fluidez ou alterar a sensibilidade da bactéria à α -defensina e outras moléculas de defesa do hospedeiro. Pridmore et al. (2004) sugeriram que esta adaptação pode selecionar fortemente a microbiota comensal com BSH, enquanto desfavorece patógenos ou outros microrganismos desprovidos desta enzima.

Compreender o mecanismo genético responsável pela adaptação do microrganismo à bile pode auxiliar no esclarecimento de infecções persistentes/crônicas e até mesmo conduzir a um novo tratamento antimicrobiano ou ajudar no desenvolvimento de estirpes probióticas mais resistentes.

2.8 MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR DE IMPORTÂNCIA PARA SAÚDE COLETIVA

2.8.1 *Salmonella* spp.

2.8.1.1 Taxonomia e características de *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos, formam gás a partir da glicose, excetuando-se os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Apresentam ainda como características metabólicas bem definidas, a capacidade de descarboxilação da lisina e ornitina, produção de gás sulfídrico e utilização de citrato como fonte única de carbono. As salmonelas são não formadoras de esporos, catalase positivas, oxidase

negativas, redutoras de nitratos a nitritos e, geralmente, móveis com flagelos peritríquios, exceção da *S. Gallinarum* e da *S. Pullorum* (HOLT et al.,1994; LE MINOR, 1984).

O gênero possui morfologia de bastonete medindo 0,7–1,5 X 2–5 µm. Metabolicamente são quimiorganotróficos tanto pela via respiratória como pela fermentativa. Os carboidratos usualmente fermentados incluem L-arabinose, maltose, D-manitol, D-manose, L-rhamnose, D-sorbitol, trehalose, D-xylose (HOLT et al.,1994; LE MINOR, 1984).

No início do século XX, a caracterização das bactérias do gênero *Salmonella* ainda era confusa. A partir de 1925, começou a ficar mais clara devido a utilização de provas sorológicas, sendo incluídos no gênero *S. Typhimurium* e *S. Paratyphi*. Posteriormente, foram descritos vários sorotipos do gênero *Salmonella*, classificados através da terminologia de White, em 1929, atingindo aproximadamente 900 sorotipos, que deram origem ao esquema de Kauffman-White, reconhecido a partir de 1932. A sorotipagem de Kauffman-White é a técnica de maior utilidade para a diferenciação de sorotipos dentro do gênero, com base na hibridação DNA/DNA e em propriedades bioquímicas (HOLT et al.,1994; LE MINOR, 1984).

Baseando-se na homologia do DNA foi efetivada a inclusão do gênero *Arizona* e atualmente, com base em características fenotípicas, o gênero é dividido em duas espécies e seis subespécies ou subgêneros, *S. enterica* (subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *S. bongori*. Em cada subespécie é reconhecido diferente número de sorovares, tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), perfazendo atualmente, mais de 2500 sorovares (HOLT et al.,1994; LE MINOR, 1984).

As salmonelas podem ser divididas em três categorias com base na especificidade do hospede e padrão clínico por eles determinado: salmonelas altamente adaptadas ao homem, incluindo os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifóide e paratifóide); salmonelas altamente adaptada aos animais, representadas por *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais. Entretanto, em determinadas situações (idade jovem, pacientes com doenças crônicas, idosos, imunocomprometidos) os sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* podem determinar no homem, um quadro septicêmico, isto é, mais

grave que o causado por *S. Typhi*. A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, salmonelas zoonóticas, responsáveis por quadro de gastroenterites (enterocolites) ou doenças de transmissão alimentar. Para os sorovares da subespécie entérica, que representa mais de 99,5% das estirpes isoladas, são dados nomes que não são colocados em itálico e a primeira letra deve ser escrita em maiúscula, como segue o exemplo: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis ou *Salmonella* Enteritidis (HOLT et al.,1994; LE MINOR, 1984).

Sua virulência é multifatorial, incluindo mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxinas, sendo desconhecido o exato papel de cada um para a manifestação da doença (RODRIGUES, 2005).

Comparando com outros bastonetes Gram negativos, as salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais. A adaptabilidade fisiológica de *Salmonella* spp. é demonstrada por sua habilidade para proliferar em pH entre 7,0-7,5 (extremos 3,8-9,5), temperaturas de 35- 43°C (extremos de 5 a 46°C) e uma atividade de água (Aa) de 0,99 até 0,94, podendo ser observadas variações entre sorovares ou estirpes. Nos produtos secos, como chocolate, cacau em pó, especiarias ou leite congelado e em produtos congelados como os sorvetes, o normal é a sobrevivência por períodos de tempo prolongados. A bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70°C, no entanto a termorresistência pode incrementar-se com menor coeficiente de água. A inativação ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com Aa superior a 0,95. Atividades de água inferiores aumentam a termorresistência (JAY, 2005; HOLT et al.,1994; LE MINOR, 1984).

A tolerância ao sal, ácido resistência são independentes. Certos processos como a salmoura (9,0% de sal) e o defumado têm um efeito limitado na inativação das salmonelas. Tem sido observado que estas bactérias podem sobreviver por vários meses na salmoura com cerca de 20% de sal, cujos produtos têm elevado teor protéico ou de gordura. Na carne seca defumada, bem como em pescado, podem sobreviver por várias semanas ou meses. A relativa resistência que estes microrganismos apresentam à dessecação, congelamento, salmoura e defumação, explica porque sobrevivem em muitas classes de alimentos. O efeito bactericida das condições ácidas é acidulante dependente, isto é, de acordo com a

natureza do ácido utilizado para a acidificação, revelando-se o ácido acético e ácido propiônico, mais inibitórios que o ácido láctico e o ácido cítrico (JAY, 2005; RODRIGUES, 2005).

2.8.1.2 *Salmonella* spp. e saúde coletiva

O gênero *Salmonella* tem grande importância para a saúde pública, considerando-se seu caráter zoonótico e sua ampla distribuição na natureza. Entre os 2.500 sorotipos de salmonelas existentes, a maioria tem sido responsável principalmente por surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), em vários países do mundo, incluindo o Brasil (TAUNAY, 1996).

A produção industrial de alimentos de origem animal e o intercâmbio comercial intensivo de animais e produtos derivados destinados ao consumo humano têm favorecido a introdução e disseminação de novos sorotipos de salmonelas na cadeia alimentar. Isto se deve, principalmente, às trocas dos hábitos alimentares, à maneira pela qual os produtos de origem animal são comercializados e às deficiências de produção, estocagem e distribuição desses produtos (CAFFER; EIGUER, 1994). Alguns estão associados com determinadas fontes de contaminação, e são isolados com maior frequência em uma área geográfica específica. Outros podem ser frequentemente isolados em diferentes países, a exemplo de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

O sorotipo de maior significância em saúde pública é o da *Salmonella* Enteritidis (POPPE, 1994), relacionado com infecção alimentar por ovos e seus derivados (SMITH, 1989). No Brasil, significativo aumento de *S. Enteritidis* foi detectado a partir de 1993, tornando-se, desde 1994, o sorotipo de *Salmonella enterica* mais frequentemente isolado de casos de infecções humanas, e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo humano (RODRIGUES, 2005). Em muitos casos, a *S. Enteritidis* determina uma doença autolimitante, mas particularmente em crianças e idosos, pode ser grave o suficiente para requerer internamento hospitalar, por se tornar invasiva e causar a morte (JAY, 2005). A variação entre as estirpes pode afetar a resposta imune, quanto à infectividade e à invasão (FORSYTHE, 2002). A transmissão de agentes infecciosos dentro de uma população é uma das preocupações em saúde

coletiva (GERMANO; GERMANO, 2001).

Segundo Grissi et al. (1983), a *Salmonella* Typhimurium é um importante agente causador de gastroenterite, mas também é responsável por infecções nos lactentes e importante agente na infecção hospitalar. Em crianças que cursam com bacteremia, freqüentemente ocorrem o acometimento pulmonar.

Para agravar a situação da salmonelose no cenário mundial, passaram a ser relatados, nos EUA, surtos de infecção alimentar com amostras resistentes a vários antimicrobianos, como a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfas e tetraciclina (CODY et al., 1999).

No Reino Unido, a *Salmonella* Typhimurium, é responsável por surtos de infecção alimentar, causando gastroenterite. Este patógeno apresenta um padrão múltiplo de resistência a antimicrobianos e possuem estirpes fermentadoras de lactose que dificultam o diagnóstico da doença. As taxas de mortalidade entre humanos e animais contaminados por esta bactéria são elevadas, o que ressalta ainda mais a importância das pesquisas que visem a prevenir a disseminação das salmoneloses (McDONOUGH et al., 2000).

Os principais alimentos envolvidos em surtos são todos aqueles com alto teor de umidade e com alta porcentagem de proteína. Produtos lácteos (leite e queijos cremosos), ovos (pudins, gemadas, licores de ovos, maioneses), carnes e produtos derivados (de bovinos, suínos e aves). São apontados, ainda, como responsáveis pela ocorrência de surtos de salmoneloses: peixes, camarões, pernas de rã, levedura de cerveja, coco, molhos e temperos de saladas, mistura para bolos, sobremesas recheadas com cremes, gelatina em pó, manteiga de amendoim, cacau, chocolate e até mesmo suco de laranja não pasteurizado (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.8.1.3 Epidemiologia

As salmoneloses apresentam distribuição mundial, com ocorrência de sorovares regionais, sendo reconhecidas universalmente como zoonoses. A maior disseminação dos agentes verifica-se nas aves e suínos (GERMANO; GERMANO, 2003).

O habitat primário da *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais, como

pássaros, répteis, animais de granja, homem e ocasionalmente insetos. Embora seu habitat primário seja o trato intestinal, a salmonela pode ser encontrada, de tempos em tempos, em outras partes do corpo. Como forma intestinal, os microrganismos são excretados nas fezes, das quais podem ser transmitidos por insetos e por outros organismos vivos para um grande número de localidades. Dessa forma, a *Salmonella* spp. pode também ser encontrada na água, especialmente em águas poluídas. Quando água poluída e alimentos que foram contaminados são consumidos por pessoas e outros animais, esses microrganismos são novamente excretados no material fecal, continuando o ciclo. O aumento deste ciclo por meio da navegação internacional de animais e de alimentos é, em grande parte, responsável pela distribuição mundial das *Salmonella* spp. e de seus conseqüentes problemas (JAY, 2005).

As carnes e seus derivados são alimentos bastante susceptíveis à contaminação por *Salmonella* spp. (FSIS, 1998). Esse fato está relacionado à dificuldade de manter os lotes de animais livres de *Salmonella* spp. no sistema vertical de produção e distribuição dos animais. Ao lado disso, o crescimento da participação de vegetais como fonte de infecção para humanos está sendo atribuída ao manejo das culturas, a exemplo da utilização de fertilizantes contaminados, ao processamento do produto e ao modelo globalizado de circulação dos alimentos entre os países (D'AOUST, 1994).

Outro fato importante em relação a contaminação de alimentos, é que apesar da *Salmonella* spp. ser considerada um microrganismo de ampla disseminação, e ser capaz de difundir-se com facilidade pelos alimentos a partir de um foco de contaminação, seja contaminação cruzada, equipamentos ou utensílios não higienizados, manipulador ou animal doente ou portador assintomático, plantas de processamento em condições de higiene deficientes, entre outras causas, estes microrganismos são encontrados em pequenas quantidades nos alimentos, pois não são bons competidores além de serem fortemente inibidos pela microbiota láctica, bem como pelas demais bactérias deteriorantes ou patogênicas presentes nos alimentos (PINTO, 2000).

Os indivíduos mais susceptíveis são os idosos e as crianças, nos quais os sintomas são geralmente mais severos e por vezes ocorre o desenvolvimento de outras enfermidades. A salmonelose pode estar associada à Síndrome de Reiter, que tem predileção pelos mais jovens; e também por portadores da Síndrome da

Deficiência Adquirida (SIDA), uma vez que bacteremias recorrentes podem ser o sinal de tal enfermidade. Outras patologias pré-existentes modificam o comportamento das salmonelas como a esquistossomose, a anemia falciforme e a verruga peruana, onde estudos relataram que alterações do complemento ou deficiências na fagocitose levam ao desenvolvimento de bacteremias. Em alguns casos a susceptibilidade pode ser aumentada por fatores ligados ao mecanismo de virulência do patógeno em questão, como é o caso de suplementações com ferro, pois a salmonelas necessitam de ferro para desenvolver-se e produzir fatores de virulência, assim como antimicrobiano-terapia nas infecções por estirpes resistentes, dietas pobres em proteínas que aumentam a susceptibilidade a infecções por enteropatógenos de maneira geral, entre outros fatores (TRABULSI; TOLEDO, 1998; VARNAN; EVANS, 1996).

A freqüência de ocorrência de *Salmonella* spp. em populações de animais susceptíveis, deve-se, em parte, à contaminação de animais livres de salmonelas por animais que portam este microrganismo ou que são infectados pelo patógeno. Estudos realizados em matadouros, no Brasil, visando a identificação de animais portadores, há descrição de que pesquisadores encontraram taxas de 7,2% de portadores intestinais das 3020 amostras de fezes examinadas, onde 147, ou 24,5% correspondiam a suínos; 35, ou 8,7% aos eqüinos; 13, ou 2,6% das aves; 9, ou 1,8% aos bovinos; 3, ou 1,7% aos felinos; 5 ou 1,6% aos caninos e 5, ou 1,4% aos leporinos. De caprinos e ovinos não foi isolada nenhuma salmonela. Em mais de 70% dos isolamentos realizados, os sorotipos mais freqüentes foram representados pela *S. Derby*, *S. Typhimurium* e *S. Anatum*, com predomínio de *S. Derby* nos suínos e *S. Typhimurium* nas aves, cães, gatos e coelhos e da *S. Anatum* nos eqüinos. A *S. Dublin* predominou nos bovinos (PARDI et al., 2001).

Em exames do conteúdo do rúmen de gado saudável após abate, salmonelas foram encontradas em 45% das amostras. Também em amostras coletadas do ambiente de transporte do gado até o abatedouro, cerca de 57% foram positivas para este microrganismo. Em uma pesquisa em abatedouros de frangos, foi encontrada a taxa de 3 a 5% de portadores intestinais de salmonelas (JAY, 2005). Em abatedouro de suínos, Lima (2004) ao pesquisar *Salmonella* spp. em diferentes etapas do abate encontrou a freqüência de isolamento de 11,7%, com risco igual de ocorrência do patógeno em todas as etapas do processamento de carne suína. Kampelmacher (1963) descreveu a presença, em suínos, de salmonela no baço, no

fígado, na bile, nos linfonodos portais e mesentéricos, no diafragma, na coluna e nas fezes dos animais.

Em aves, uma forma de transmissão muito importante do gênero *Salmonella* é a vertical ou transovariana, onde os pintos já nascem infectados, ou a bactéria tem contato com as aves através da casca do ovo no momento da eclosão. As aves assim infectadas eliminam a bactéria via fezes transmitindo-a horizontalmente aos pintos saudáveis que, logo após a eclosão, são altamente suscetíveis à infecção por *Salmonella* spp. (SANTOS et al., 2005).

Nos ovos para consumo, a *Salmonella* Enteritidis pode ser transmitida através da infecção do oviduto, resultando na contaminação da albumina e contaminação dos ovos durante sua formação (DESMIDT et al., 1997). Há também a possibilidade de ovos se tornarem contaminados após a formação da casca pelo contato com fezes contaminadas na cloaca ou mesmo no ambiente (SANTOS et al., 2005).

As rações avícolas e suas matérias primas podem estar contaminadas por uma variedade de sorovares de salmonelas. As matérias primas de origem animal são de longe, as mais importantes, como fontes de salmonelas. Destacando-se, sobretudo, a farinha de pena e vísceras. A contaminação está ligada, invariavelmente, a falha operacional na graxaria permitindo a contaminação cruzada entre vísceras cruas e cozidas nos abatedouros, ou falhas em procedimentos operacionais entre áreas sujas e limpas (SILVA, 2005).

Alimento que contenha número significativo de *Salmonella* spp. é um risco em potencial para o consumidor. Sua frequência ou persistência, como uma das causas de morbidade humana, depende essencialmente, do sorovar envolvido, dose infectante, características ubiqüitárias, condições higiênicas e sanitárias dos alimentos e hospedeiros, presença de vetores mecânicos, sistema de criação dos animais, como também das rações utilizadas (RODRIGUES, 2005).

2.8.1.4 Patogênese e sinais clínicos

Como muitas outras espécies patogênicas entéricas, a *Salmonella enterica* invade as células dos mamíferos no trato intestinal, por meio da indução de rearranjos da actina, o que resulta na formação de pseudópodos que engolfam a bactéria (FORSYTHE, 2002).

As linhagens de *S. enterica* iniciam a infecção nas células não-fagocitárias, unindo-se a mucosa intestinal com a ajuda de fímbrias adesivas codificadas por um gene na ilha de patogenicidade 1 (SPI-1). Em seguida, ocorre a penetração da mucosa intestinal, principalmente nos folículos linfóides na placa de Peyer. Das vesículas dessas células, as salmonelas penetram nos lisossomos. Linhagem virulenta de *S. enterica* secreta uma proteína no citoplasma que previne a fusão das vesículas com os lisossomos. A *S. Typhimurium* contém fímbrias que aderem seletivamente às células M. Sua entrada em células não-fagocitárias é auxiliada pelo sistema de secreção do tipo III (também conhecido como “contato”). O mecanismo de penetração envolve uma interação profunda entre a bactéria e a célula hospedeira, que resulta em uma “comunicação cruzada” (JAY, 2005). Segundo Forsythe (2002), o efeito da bactéria na célula hospedeira é denominado de arrepio, devido à aparência de deformação da membrana celular. A invasão é aumentada sob condições anaeróbias, quando as células estão no estágio estacionário e quando a osmolaridade é alta.

Como consequência da internalização da bactéria na célula hospedeira, ocorrem rearranjos no citoesqueleto e desorganização da membrana, sendo seguidos pela absorção das bactérias por macropinocitose. Ocorre a migração de neutrófilos por meio de células epiteliais, e citocinas (por exemplo, interleucina 8) são produzidas. Uma vez dentro dessas células, as bactérias permanecem em vacúolos durante todo o seu estágio intracelular. Após a multiplicação, as células são rompidas, e o patógeno é disseminado. A penetração das salmonelas nos macrófagos é acompanhada pela desorganização da membrana e de macropinocitose. Uma vez dentro das células, as salmonelas se alojam nos fagossomos ligados à membrana, os quais aumentam de tamanho (JAY, 2005). O microrganismo pode sobreviver no fagossomo devido à sua resistência aos estresses oxidativos por meio da produção de catalase e de superóxido desmutase e da resistência às defensinas (peptídeos tóxicos) devido ao produto do *operon phoP/phoQ* (FORSYTHE, 2002).

Postula-se que enteroxinas produzidas por *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* tenham modo de ação semelhante à toxina da cólera, ou seja, interfere no mecanismo de controle e atividade da adenilciclase e que as salmonelas produzem uma única citotoxina responsável por injúrias na mucosa intestinal (JAY, 2005).

Na infecção alimentar por *Salmonella* spp., a síndrome é causada pela ingestão de alimentos que contenham números significativos de espécies ou sorovares não-hospedeiro-específicos deste gênero. Os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão de alimentos, embora períodos mais curtos e longos já tenham sido relatados. Os sintomas consistem em diarreia, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça e calafrios. Também pode ocorrer fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, os quais persistem por 2 a 3 dias (JAY, 2005). Estes prazos dependem, sobretudo, da dose infectante ingerida, do sorovar envolvido e das condições do próprio hospedeiro (GERMANO;GERMANO, 2003).

2.8.1.5 Medidas de controle e prevenção

Segundo HAYES (1993), são consideradas medidas de controle e prevenção: eliminar as salmonelas das granjas reprodutoras; melhorar as condições higiênicas dos matadouro e das granjas avícolas; evitar os riscos da contaminação cruzada, especialmente dos alimentos cozidos pelos crus, em fábricas e cozinhas; assegurar um aquecimento suficiente dos alimentos, seguido de uma refrigeração rápida quando forem armazenados; refrigerar os alimentos quando possível e evitar deixá-los muito tempo a temperatura ambiente; comprovar que os manipuladores de alimentos não são portadores de salmonelas; controlar os roedores, pássaros e insetos nas fábricas e terrenos adjacentes; e incrementar a vigilância e detecção de salmonelas sobre todos os alimentos cozidos.

Tortora et al. (1993) enfatizam que a prevenção de salmoneloses depende das práticas sanitárias corretas para se evitar a contaminação e da refrigeração adequada para prevenir o crescimento do número de bactérias. O microrganismo só pode ser destruído pela cocção normal, sendo uma temperatura de 68°C suficiente para eliminar os microrganismos.

Em relação a adoção de medidas que previnam a contaminação dos produtos de origem animal, deve-se atentar para as possibilidades de contaminação do animal, bem como da contaminação cruzada. A primeira tem início a partir das boas práticas de manejo, como o controle de qualidade das rações fornecidas aos animais, pois uma vez contaminadas, infectam os animais ao consumi-las; medidas de

higiene devem ser aplicadas também nos currais onde a partir das fezes e bebedouros podem ocorrer a disseminação de enfermidades. Cuidados especiais devem ser tomados durante as operações de abate, evitando-se ao máximo contaminações no ato da esfolação. Em seqüência, a evisceração é um ponto crítico e deve obrigatoriamente ser precedida, nos bovinos, pelas oclusões de reto e porção cranial do esôfago, afim de evitar a ruptura de segmentos do trato gastrintestinal. Estes procedimentos devem estar presentes em todas as plantas de processamento, devendo seguir até a obtenção do produto final, estocagem, preparo e consumo (PARDI et al., 2001, WELLS et al., 2001).

A implementação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos princípios da Análise de Perigo e Ponto Crítico de Controle (APPCC), são os instrumentos mais significativos para o controle das salmoneloses em criações, indústrias e estabelecimentos manipuladores de alimentos (BARROS; PAVIA; PANETTA, 2002; GERMANO; GERMANO, 2001).

2.8.2 *Escherichia coli*

2.8.2.1 Taxonomia e característica de *E. coli*

As bactérias entéricas correspondem a um grupo relativamente homogêneo, do ponto de vista filogenético, de proteobactérias gama, caracterizadas fenotipicamente por bacilos não esporulantes, Gram negativos, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia, aeróbios facultativos, oxidase negativos, com exigências nutricionais relativamente simples, fermentando açúcares e originando uma série de produtos finais. Quase todas as estirpes de *E. coli* são móveis por meio de flagelos peritríquios. Existem pelo menos 50 antígenos flagelares (H) sorologicamente distintos (KRIEG; HOLT, 1984; ORSKOV, 1984).

E. coli produz indol e a enzima β -glicuronidase, mas não produz sulfeto de hidrogênio nem hidroliza a uréia. A β -glicuronidase é produzida por 96% das estirpes, incluindo as anaerogênicas, mas não pelos outros membros da família *Enterobacteriaceae*, exceto *Shigella* (44%) e *Salmonella* (29%). Um dos substratos mais utilizados para verificar a presença da β -glicuronidase é o 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG), composto não fluorescente que, quando degradado pela

β -glicuronidase, resulta na 4-metilumbeliferona, fluorescente sob luz UV. O MUG ou seus similares cromogênicos têm sido amplamente utilizados em uma nova geração de meios de cultura, para quantificação diferencial de *E. coli* em água e alimentos (KRIEG; HOLT, 1984; SILVA, 2004).

A *Escherichia coli* faz parte do grupo coliformes termotolerantes que produzem ácido e gás em Caldo *Escherichia Coli*, em temperaturas de 44,5 e 45,5°C. Um teste para coliformes termotolerantes é um teste para *E. coli* típicas, embora algumas espécies de *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. se adequem a esta definição (JAY, 2005; KORNACKI; JOHNSON, 2001). Dentre as bactérias de “habitat” reconhecidamente fecal, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não entéricos. Embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, ainda sim é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, principalmente, pela sua relação com a presença de outros enteropatógenos, como por exemplo *Salmonella* spp. (JAY, 2005).

Visto que a *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal, estando implícitas as condições de higiene e sanidade do produto analisado, torna-se desejável identificar a incidência de *E. coli* na população analisada e a partir de provas bioquímica denominadas IMViC (Indol, Vermelho de metila, Voges Proskauer e Citrato) pode-se indicar a presença de *E. coli* através de reações (+,+, -, -) para o tipo I ou típica e (-, +, -, -) para o tipo II ou atípica (JAY, 2005; KRIEG; HOLT, 1984).

Os membros do gênero *Escherichia* são considerados praticamente universais do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, embora não correspondam aos organismos dominantes nesses “habitats”. Espécies de *Escherichia* podem desempenhar um papel nutricional no trato intestinal, pela síntese de vitaminas, particularmente a vitamina K. Devido à sua natureza aeróbia facultativa, esse organismo provavelmente também auxilia no consumo de oxigênio, tornando o intestino grosso anóxico. Linhagens selvagens de *Escherichia* raramente apresentam exigências em relação a qualquer fator de crescimento, sendo capazes de crescer a partir de uma grande variedade de fontes de carbono e energia, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros (MADIGAN et al., 2004).

Polissacarídeos capsulares (antígenos K) são importantes para microrganismos que entram em contato com produtos e células do hospedeiro, como as estirpes invasivas de *E. coli*. As substâncias da cápsula protegem a

membrana externa do complexo de ataque à membrana da cascata do complemento e impedem que o microrganismo se ligue a células hospedeiras fagocíticas e seja ingerido. Existem pelo menos 80 antígenos K distintos. Os antígenos O, H e K são usados na sorotipagem de um isolado em particular. Por exemplo, O141:K85:H3 descreve um isolado com antígenos somáticos do grupo 141, antígeno capsular 85 e antígeno flagelar 3 (HIRSH; ZEE, 2003).

As adesinas medeiam a aderência aos alvos celulares no trato gastrointestinal e às células que compõem o nicho para a cepa. Por causa de sua relativa hidrofobicidade, as adesinas também podem promover associação à membrana dos fagócitos. As adesinas constituem importante fator de virulência somente quando o microrganismo está em superfícies mucosas (HIRSH; ZEE, 2003).

A *E. coli* é um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7°C e 46° C, sendo 37° C a temperatura ótima, embora existam estirpes que possam se multiplicar a 4° C. É destruído a 60° C, em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração. O pH, próximo do neutro, propicia condições ótimas para o desenvolvimento da *E. coli*; a multiplicação pode ocorrer abaixo dos 4,4, desde que os demais fatores intrínsecos e extrínsecos sejam ótimos. A mínima exigida para desenvolvimento é de 0,95. Todas as estirpes patogênicas de *E. coli* são destruídas pelos desinfetantes clorados e pelas radiações gama (GERMANO; GERMANO, 2001).

No caso particular da *E. coli* O157:H7 devem ser observadas as seguintes condições favoráveis ao seu desenvolvimento e resistência: cresce pouco ou não cresce a 44°C, não fermenta o sorbitol e não produz a β -glucuronidase, pH ótimo de 7,5 apesar de apresentar grande tolerância a variações; desenvolvimento em caldo com 6,5% de NaCl, embora lentamente; sobrevivência por longos períodos, em alimentos fermentados ou ácidos (FORSYTHE, 2000; GERMANO; GERMANO, 2001, JAY, 2005).

2.8.2.2 *E. coli* e saúde coletiva

Na atualidade dentre os agentes de doenças transmitidas por alimentos, a *E. coli* passou a merecer especial atenção da indústria de produtos alimentícios, das autoridades de saúde e também da própria sociedade, todos preocupados com suas

graves conseqüências (GERMANO; GERMANO, 2001). Segundo Franco (2002), a presença de *Escherichia coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos.

As linhagens patogênicas de *E. coli* são baseadas nas características das doenças, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos, são reconhecidos seis grupos de *E. coli* virulentos: *E. coli* enteroagregativas (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (JAY, 2005; SILVA, 2004).

Dentre as inúmeras estirpes enterovirulentas do microrganismo, a que constitui maior apreensão para as autoridades de saúde é a *E. coli* O157:H7 responsável pela forma enterohemorrágica da infecção (GERMANO; GERMANO, 2001). *E. coli* O157:H7 é responsável por pelo menos 60.000 infecções e 500 mortes a cada ano decorrentes de agentes etiológicos veiculados por alimentos, sendo a principal responsável por insuficiência renal em crianças. A causa mais comum dessa infecção corresponde ao consumo de carne crua ou mal cozida contaminada, especialmente carnes moídas processadas em massa (MADIGAN et al., 2004).

Segundo Franco e Landgraf (1996), o bovino é considerado reservatório natural de EHEC, razão pela qual os alimentos de origem animal, principalmente a carne bovina parecem ser o principal veículo desse patógeno. Jay (2005) afirmou que a incidência de EHEC também envolve aves domésticas e frutos do mar.

2.8.2.3 Epidemiologia

A *E. coli* faz parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e de diversos animais, está incluída na família *Enterobacteriaceae*, onde estão alocados os mais importantes patógenos de origem entérica. A maioria das estirpes patogênicas relacionadas aos distúrbios gastroentéricos (diarréias), com exceção das estirpes enterohemorrágicas que estão relacionadas à Colite Hemorrágica (CH) e a Síndrome Urêmica Hemorrágica (SUH), são de origem humana, contudo algumas estirpes ETEC responsáveis por doenças humanas são carregadas através dos animais (MENG; FENG; DOYLE, 2001; VARNAN; EVANS, 1996).

A EIEC é rara em países desenvolvidos, os surtos são esporádicos e as fontes de infecção, freqüentemente permanecem desconhecidas. As pessoas de maior risco são aquelas que vivem em áreas onde a higiene é precária e outras doenças, particularmente a cólera, são endêmicas. Infecções com estirpes de EIEC não estão associadas especificamente com diarreia dos viajantes, entretanto, pessoas que visitam áreas onde a ocorrência é alta, estão obviamente expostas ao risco (EDELMAN et al., 1988).

Geralmente as estirpes EIEC acometem mais comumente crianças maiores e adultos, contudo, seu isolamento de pacientes com diarreia não é freqüente. Alguns estudos têm apontado surtos relacionados com a ingestão de água e/ou alimentos contaminados com EIEC. Entretanto, acredita-se que a via de transmissão mais comum seja o contato interpessoal (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Em relação às estirpes EHEC, para Bettelheim (2002), o gado pode ser um importante reservatório de EHEC e o consumo de leite cru ou carne crua tem sido definido como fator de risco. No Brasil ainda não houve registro de surtos epidemiológicos e o número de crianças com infecções endêmicas por EHEC relatado, tem sido muito baixo (FRANCO; LANDGRAF, 1996; TRABULSI; TOLEDO, 1998).

A EPEC está associada à diarreia infantil, tanto em países desenvolvidos, onde é isolada em surtos esporádicos e com baixa freqüência nos casos de diarreias endêmicas, como naqueles em desenvolvimento, onde está entre os principais enteropatógenos da diarreia infantil, em especial dos lactentes, com altos índices de mortalidade. No Brasil, a EPEC é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses (FRANCO; LANDGRAF, 1996; VARNAN; EVANS, 1996).

A ETEC está diretamente relacionada à doença diarreica em indivíduos de todas as idades, é conhecida como a “diarreia dos viajantes”. Síndrome considerada como a mais importante causa de diarreia nos países em desenvolvimento, principalmente em regiões onde as condições de saneamento são precárias e conseqüentemente as condições de higiene são pobres. Atinge todas as faixas etárias, principalmente aqueles indivíduos que se locomovem de regiões desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento. Esses surtos ocorrem em virtude do consumo de água contaminada ou alimentos contaminados, como derivados lácteos, contudo em alguns casos os manipuladores de alimentos são

mais importantes que alimentos específicos. Entre outros organismos associados com esta síndrome, estão os rotavírus, o agente de Norwalk, *Entamoeba histolytica*, *Yersina enterocolitica*, *Giardia lamblia*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Shigella* spp. e possivelmente, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (JAY, 2005; PARDI et al., 2001; VARNAN; EVANS, 1996).

As diarreias causadas por *E.coli* apresentam distribuição mundial, porém devido à elevada subnotificação dos casos não se sabe como a real extensão de ocorrência está dimensionada, mesmo em países desenvolvidos. Em áreas onde a diarreia é endêmica, geralmente não é possível relacionar a doença com alimentos específicos. Nos casos de diarreia infantil normalmente a água utilizada no preparo do alimento é o veículo de transmissão. A partir dos relatos de surto têm-se informações que além da água de bebida, outros alimentos já foram identificados como veículo, com destaque para o leite e seus derivados, a carne e seus derivados e os alimentos manipulados (GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005).

2.8.2.4 Patogênese e sinais clínicos

Estirpes patogênicas de *E. coli* excretam pelo menos cinco produtos importantes do ponto de vista médico: enterotoxinas, sideróforos, toxina shiga-símile (verotoxina), fator citotóxico necrosante e hemolisina (HIRSH; ZEE, 2003).

Usualmente, as enterotoxinas são proteínas codificadas por plasmídeos e ocorrem sob duas formas. Uma, toxina lábil (LT), é uma proteína imunogênica termolábil com peso molecular de 91.000 Da que é antigenicamente relacionada com a toxina colérica. A outra, toxina estável (ST), é uma família de proteínas não-imunogênicas com peso molecular de 1.500 a 2.000 Da. Essas exotoxinas protéicas afetam a regulação da atividade dos nucleotídeos cíclicos dentro das células. A LT afeta o sistema adenilciclase e a ST o sistema guanilciclase. A LT é composta de duas subunidades, A e B. A subunidade B é um multímero que se liga a gangliosídeos na superfície da célula, seguindo-se a translocação da subunidade A através da membrana celular. Após ativação, a subunidade A separa nicotinamida de Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo (NAD) e acopla o restante ribosil-adenina-difosfato à proteína reguladora G do sistema enzimático adenilciclase. O resultado é desregulação da adenilciclase, causando excessiva produção de AMP cíclico (fosfato

de adenosina 3':5'-cíclico). Isto resulta na abertura dos canais de cloreto nas células da cripta e no bloqueio da absorção de NaCl nas células das extremidades apicais. Como consequência, água e eletrólitos (cloreto, sódio e íons bicarbonato) são perdidos no lúmen intestinal. Esses eventos provocam diarreia, hipovolemia, acidose metabólica e, se a acidose for grave, hipercalemia (HIRSH; ZEE, 2003).

E. coli enteroagregativa (EaggEC) causa diarreia aquosa persistente, principalmente em crianças, durando mais de 14 dias. A EaggEC alinha-se paralelamente em fileiras, tanto nos tecidos celulares, quanto em lâminas. Essa agregação foi descrita como “empilhamento de tijolos”. Produzem uma toxina termossensível, relacionada antígenicamente a hemolisina, mas que não é hemolítica e uma toxina termoestável codificada por um plasmídeo, sem qualquer relação com a enterotoxina termoestável da ETEC. Imagina-se que a EaggEC adere à mucosa intestinal e elabora as enterotoxinas e citotoxinas, as quais resultam em diarreia secretória e em danos na mucosa. Estudos recentes confirmam a associação da EaggEC à má-nutrição e com o retardo de crescimento, na ausência de diarreia (FORSYTHE, 2000).

Estirpes de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) geralmente não produzem enterotoxinas, porém causam diarreia aquosa ou sanguinolenta. O mecanismo da diarreia não está completamente elucidado, mas é decorrente de plasmídeos que conferem um fator de aderência possibilitando a adesão do microrganismo ao epitélio do intestino e subsequente destruição das microvilosidades, resultando em alteração física da integridade do intestino. Após a colonização do intestino, são produzidas lesões do tipo “ligação e desaparecimento”. O processo começa com o contato inicial e acredita-se que seja ajudado por um plasmídeo que codifica pílís que formam tufo. Proteínas secretadas por EPEC bloqueiam a fagocitose e conduzem a um rearranjo de citoesqueleto e fosforilação da tirosina. Quando a tirosina liga-se a uma proteína da membrana externa, conhecida por intimina, a ligação resulta na destruição das bordas em forma de escova da microvilosidade intestinal (JAY, 2005; PADHYE; DOYLE, 1992).

Estirpes EHEC causa diarreia sanguinolenta, Colite Hemorrágica (CH), Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) e Púrpura Trombótica Trombocitopênica (PTT). Este grupo inclui a *E. coli* verotoxigênica (VTEC, também conhecida como *E. coli* produtora de shigatoxina) e os sorotipos O157, O26 e O11. Estas linhagens são

semelhantes a EPEC na produção de lesão do tipo “ligação e desaparecimento”. As linhagens EHEC afetam somente o intestino grosso (JAY, 2005; FORSYTHE, 2000).

Os adultos saudáveis sofrem de PTT, na qual as plaquetas sanguíneas envolvem os órgãos internos, conduzindo a danos nos rins e no sistema nervoso central. As pessoas mais vulneráveis da população - crianças e idosos - desenvolvem CH, doença que pode conduzir à SUH. A CH é uma forma de infecção menos grave do que a SUH, ambas causadas pela *E. coli* O157:H7. O primeiro sintoma da CH é o repentino aparecimento de graves dores abdominais. Cerca de 24 horas mais tarde, uma diarreia aquosa não-sanguinolenta inicia. Algumas vítimas sofrem de febre de curta duração. Vômitos podem ocorrer ou não. Após primeiro ou segundo dia, a diarreia torna-se sanguinolenta e o paciente passa a ter um aumento nas dores abdominais. Isso dura entre 4 a 10 dias. Nos casos mais sérios, amostras fecais são descritas como compostas por "apenas sangue e nada de fezes". Infelizmente, em alguns pacientes a CH pode progredir para SUH e complicações subseqüentes (FORSYTHE, 2000).

Na SUH, o paciente sofre de diarreia sanguinolenta, anemia hemolítica, distúrbios e falhas renais, o que requer diálises e transfusões de sangue. Os distúrbios nervosos centrais podem aparecer, os quais levam convulsões, coma e morte. A taxa de mortalidade é de 3 a 17% (FORSYTHE, 2000).

Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo, os casos notificados neste estado de SUH no período de 1998 a 2006 por todas as causas, relacionadas ou não a alimento, corresponderam a 87, com 35 óbitos e uma taxa de letalidade de 40,2% (CVE, 2007).

Entende-se por EIEC a classe de *Escherichia coli* que causa uma infecção intestinal muito semelhante à causada por *Shigella* spp. A infecção é resultante da penetração das bactérias nas células da mucosa intestinal, e conseqüente penetração nas células adjacentes. Há intensa proliferação dentro dessas células, que leva a sua morte. Não há produção de nenhum tipo de toxina. Como nas shigeloses, a infecção é causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do colon (intestino grosso). Clinicamente, as infecções se manifestam por diarreia sanguinolenta ou não, com a presença de leucócitos e muco, freqüentemente acompanhada de dores abdominais e febre. As infecções por EIEC são mais freqüentes em crianças maiores de dois anos e em adultos. A característica de invasividade, tanto da EIEC como do gênero *Shigella*, está associada à presença de

um plasmídeo (PADHYE; DOYLE, 1992).

A *E. coli* enteroxigênica (ETEC) causa diarreia aquosa, com aparência similar à água e arroz, e produz febres baixas, é muito semelhante à cólera. Estas linhagens se ligam e colonizam o intestino delgado por meio de fatores antigênicos de colonização fimbrial. Uma vez ligados, produzem uma ou duas enterotoxinas. Todas agem estimulando enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal. Esse estímulo resulta em uma menor absorção de sódio pelas células das microvilosidades intestinais e maior excreção de cloretos e bicarbonatos, com conseqüente acúmulo de líquido no lúmen intestinal e diarreia (JAY, 2005; FORSYTHE, 2000; PADHYE; DOYLE, 1992).

Estirpes de *E. coli* difusamente aderente (DAEC), acomete indivíduos cujo sistema imunológico não está totalmente formado e também crianças mal nutridas. A diarreia desencadeada é aquosa. Esta classe também é pouco estudada do ponto de vista epidemiológico. Pouco se sabe sobre seu mecanismo de patogenicidade, porém, foi caracterizada uma fímbria de superfície, conhecida como F1845, envolvida no fenômeno de aderência difusa. Os genes que codificam esta fímbria podem estar localizados no cromossomo ou em um plasmídeo. O fenômeno de aderência difusa também parece estar associado a uma proteína de 100 kDa da membrana externa, encontrado em uma cepa do sorotipo 0126:H27. Os genes que codificam essa proteína já foram seqüenciados, porém, foram encontrados em apenas algumas estirpes DAEC isoladas (GERMANO; GERMANO, 2003; RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002).

2.8.2.5 Medidas preventivas

A prevenção e o controle passam obrigatoriamente pela higiene do abate e da ordenha; pela conservação das matérias-primas abaixo dos 7° C; pela pasteurização dos produtos lácteos e dos sucos de frutas; pela adoção das Boas Práticas Fabricação (BPF) e pela Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nas indústrias; pelos cuidados na manipulação de alimentos de origem animal crus; pela higiene das instalações e equipamentos nas cozinhas; pelo tratamento térmico dos alimentos cárneos; e, pelo resfriamento rápido dos alimentos processados abaixo de 7° C (GERMANO; GERMANO, 2001).

Devido à gravidade das conseqüências em crianças, deve-se tomar certas precauções especiais. A sensibilidade térmica desses organismos é bastante significativa. Deste modo, casos podem ser evitados se os alimentos forem cozidos apropriadamente. No caso de carne moída, a recomendação é que esta seja cozida a 71,1°C ou que a temperatura do centro da mesma seja mantida a, no mínimo, 68,3°C por pelo menos 15 segundos. Uma vez cozidos os hambúrgueres, assim como as outras carnes, não devem ser armazenados entre 4,4°C e 60°C por mais de 3 a 4 horas. Ainda que o maior surto registrado relacionado com esses microrganismos tenha sido associado a carne de gado moída, todas as carnes cruas, frangos e frutos do mar podem ser considerados como possíveis veículos para a colite hemorrágica (JAY, 2005).

2.8.3 *Staphylococcus aureus*

2.8.3.1 Taxonomia e características de *Staphylococcus aureus*

A partir do avanço da biologia molecular, estudos de análise comparativa de seqüências de RNA ribossomal, foram identificadas três linhagens celulares filogeneticamente distintas e designadas *domínios* evolutivos, sendo denominados *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. No domínio *Bacteria* são conhecidos 17 linhagens (filos) principais a partir de estudos de culturas laboratoriais; muitas outras são identificadas pela recuperação e seqüenciamento de genes RNA ribossomal de bactérias coletadas a partir de habitats naturais. Os estafilococos estão classificados no filo bactérias Gram positivas não esporulantes, com baixo conteúdo de guanina/citosina (GC) e atualmente o número de espécies chega a 39. Há ainda outros gêneros inclusos neste filo, como *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Sendo o gênero *Staphylococcus* diferenciado dos demais por possuir ácido tecóico na parede celular (MADIGAN et al., 2004).

Os estafilococos possuem 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e são em geral fortemente Gram positivos. Em exsudatos, formam cachos, pares ou cadeias curtas. Esporos e flagelos não são observados. A presença de cápsula é variável (HIRSH; ZEE, 2003). Não possuem motilidade e a porcentagem mol G/C no DNA é baixa, correspondendo à 30-39 (MADIGAN et al., 2004).

O gênero cresce rapidamente em muitos tipos de meios de cultura e mostra-se metabolicamente ativo, fermentando carboidratos e produzindo pigmentos que variam de branco a amarelo intenso. Alguns são membros da microbiota normal da pele e mucosa dos humanos; outros provocam supuração, formação de abscessos, infecções e até mesmo septicemia fatal. Os estafilococos patogênicos frequentemente hemolisam o sangue, coagulam o plasma e produzem uma variedade de enzimas e toxinas extracelulares. (BROOKS, et al., 2000).

A parede celular consiste em proteínas e polissacarídeo. Uma proteína ("fator de aglomeração", "coagulase ligada") é comumente encontrada no *S. aureus* e no *S. Intermedius*. O fator de aglomeração interage "in vitro" com fibrinogênio produzindo uma reação semelhante à aglutinação. A outra, a proteína A, produz agregação combinando-se com o fragmento Fc de imunoglobulinas. O ácido teicóico ligado ao peptidoglicano é o polissacarídeo predominante. A porção álcool é, no *S. aureus* o ribitol e, no *S. epidermidis* e no *S. intermedius*, o glicerol. Pigmentos carotenóides na membrana celular podem conferir pigmentação "áurea" (do latim *aureus*) às colônias de *S. aureus*. Este microrganismo às vezes produz cápsula e muitas vezes "pseudocápsula", uma estrutura de carboidratos associados frouxamente (HIRSH; ZEE, 2003).

As espécies de estafilococos são hospedeiro-adaptadas, e metade das espécies conhecidas habitam somente humanos ou humanos e outros animais. Os estafilococos geralmente mantêm uma relação benigna ou simbiótica com seus hospedeiros, contudo, se a barreira cutânea for rompida por trauma ou pela presença de artigos estranhos, esses microrganismos podem atingir outros tecidos e proliferar, desenvolvendo um comportamento patogênico (BENNETT et al., 1999; JAY, 2005).

Podem ser divididos em dois grupos de acordo com a produção da enzima coagulase, a qual possui a capacidade de coagular ou não o plasma sanguíneo. A síntese dessa enzima é restrita a algumas espécies do gênero, destacando-se entre elas: *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*. Os outros estafilococos que não sintetizam a coagulase são denominados Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN), e destacam-se entre o gênero o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* e o *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (KONEMAN, 1997)

Parâmetros extrínsecos como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e atividade de água (Aa) influenciam diretamente o crescimento dos estafilococos. Tal crescimento pode ser observado numa faixa de temperatura entre 10°C e 46°C, com faixa de ótimo de 30-37°C. O pH ótimo situa-se próximo da neutralidade (entre 6,0 e 7,0), mas o crescimento poderá ocorrer entre valores de 4,0 e 9,8. Com relação à Aa, considera-se 0,86 como o valor mínimo, mas há registro de crescimento com valores inferiores a 0,83 sob condições ideais (JAY, 2005).

Os estafilococos resistem a dessecação, especialmente em exsudatos, por semanas, a aquecimento de até 60°C por 30 minutos, a variações de pH entre 4,0 e 9,5 e a concentrações salinas de 7,5% utilizadas nos meios seletivos para isolá-los. Corantes bacteriostáticos como cristal-violeta, desinfetantes como clorexidina e diversas drogas anti-microbianas e sais biliares inibem os estafilococos (HIRSH; ZEE, 2003).

2.8.3.2 *Staphylococcus aureus* e saúde coletiva

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, as quais são produzidas somente por algumas espécies e linhagens de estafilococos. Embora a produção de enterotoxinas esteja geralmente associada a *S. aureus* coagulase e termonuclease positivos, algumas espécies de estafilococos que não produzem nenhuma dessas enzimas também podem produzir enterotoxinas (JAY, 2005).

Em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos, o *S. aureus* é considerado como um dos mais freqüentes causadores de surtos de toxinfecção, devido ao importante papel desempenhado pelos manipuladores, durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos, somado aos riscos de contaminação das matérias-primas desde sua origem e às temperaturas inadequadas de conservação pós-coção (GERMANO; GERMANO, 2003).

Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do estado de São Paulo, o *S. aureus* é um dos principais causadores de intoxicação alimentar. A real freqüência da intoxicação estafilocócica é desconhecida, seja por erro diagnóstico, por ser similar a outras intoxicações, como, por exemplo, *Bacillus cereus*; por coleta inadequada de amostras para testes laboratoriais, exames laboratoriais

impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos. No estado de São Paulo foram notificados 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002. Em 2003, dos 46 surtos com agente etiológico conhecido, ocorridos no Brasil, 6,6% teve como causa intoxicação por *S. aureus* (CVE, 2003). Segundo Brasil (2003) nos anos compreendidos entre 1999 a 2004 dos 3.737 surtos, 80% (2.989/3.737) foram encerrados sem dados sobre o agente etiológico, 4,4% pelo critério clínico-epidemiológico e somente 15,5% (581/3.737) pelo critério laboratorial clínico e/ou bromatológico. Destes, 34,7% (202/581) foram causados por *Salmonella* spp., seguida pelo *Staphylococcus aureus* (11,7%) e outros agentes.

Em geral, pode-se esperar a presença de estafilococos, mesmo que em pequenas quantidades em quase todos os alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados, a não ser que tenham sido aplicados tratamentos térmicos para a destruição desses microrganismos (JAY, 2005).

Segundo dados do Centro de Vigilância epidemiológica há vários alimentos incriminados como: carnes e produtos cárneos; aves e ovos; saladas com ovos, atum, galinha, batata, macarrão; patês, molhos, tortas de cremes, bombas de chocolate e outros; sanduíches com recheios; produtos lácteos e derivados. São de alto risco os alimentos que requerem considerável manipulação para seu preparo e que permanecem em temperatura ambiente elevada e por muito tempo após sua preparação. *Staphylococcus* spp. existem no ar, na poeira, em esgotos, água, leite, em superfícies e equipamentos, em humanos e animais (CVE, 2003).

Quando tais alimentos são mantidos sob refrigeração após o preparo, geralmente permanecem seguros, uma vez que o crescimento de *S. aureus* é significativamente reduzido em temperaturas baixas. No entanto, os alimentos muitas vezes permanecem à temperatura ambiente. Se um alimento for inoculado com células de *S. aureus* oriundas de um manipulador infectado poderá ocorrer o rápido crescimento bacteriano e a produção de enterotoxinas. Mesmo que alimentos contendo toxinas sejam submetidos ao reaquecimento, a toxina permanecerá ativa, visto ser relativamente termoestável (MADIGAN et al., 2004).

2.8.3.3 Epidemiologia

O *S. aureus* apresenta distribuição mundial. Estima-se que 20% até 60% da população humana possa ser portadora da bactéria, sem apresentar qualquer tipo de doença. Nestas circunstâncias, os portadores humanos, mesmo em condições normais de saúde, sempre representam risco quando lidam com alimentos, pois podem contaminá-los durante as diferentes fases de preparação, através das mãos e das secreções oro-nasais. Os portadores de infecções purulentas, notadamente nas mãos, devem se abster de lidar com quaisquer tipos de alimentos (GERMANO; GERMANO, 2001).

O reservatório do microrganismo são os seres humanos na maioria das vezes; a transmissão ocorre devido a ferimentos nas mãos ou outras lesões purulentas ou secreções que contaminam os alimentos durante sua manipulação. Cerca de 25% das pessoas são portadores nasais. A disseminação entre as espécies parece ser limitada, porém úberes infectados de vaca, pássaros e cachorros também podem transmitir a bactéria. Grande parte das infecções de animais é provavelmente endógena, isto é, provocada por uma cepa residente (CVE, 2003; HIRSH; ZEE, 2003).

A competição com outros tipos de bactérias nos alimentos pode reprimir ou retardar o crescimento de estafilococos e, conseqüentemente, a produção de toxina, podendo ainda ocorrer a alteração do alimento pelos outros microrganismos associados, diminuindo-se, com isso, o perigo do consumo. A contenção do crescimento depende do tipo e número dos organismos que competem, da natureza do alimento, da temperatura e do tempo de ação. Os estafilococos contaminam o alimento com pequeno contingente e, via de regra, são muito menos abundantes nos alimentos crus que as bactérias competidoras. Também são maus competidores, contudo, nos alimentos tratados pelo calor; não se observa a competição, crescendo então sem restrições (PARDI et al., 2001).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* apresenta resistência a diversos fármacos. Os microrganismos envolvidos na propagação de eventos epidemiológicos como o *S. aureus*, têm a capacidade de neutralizar quase todos os antimicrobianos acessíveis para o tratamento de infecções severas. O aparecimento de estafilococos multirresistentes, desde 40 anos atrás, tem sido atribuído inevitavelmente às características genéticas desses microrganismos que

sofreram pressão seletiva imposta pela terapia antimicrobiana. A rápida emergência da resistência pela introdução de antibióticos na área clínica deve a habilidade da população microbiana em adaptar-se agilmente às mudanças em seu ambiente (RICHMOND, 1972).

Em Maringá-PR, foram avaliados 16 antimicrobianos utilizados na profilaxia ou terapêutica de infecções comunitárias de tecido cutâneo e subcutâneo. Das 107 amostras de pacientes com queixa de infecções com abscedação da pele e tecido subcutâneo, 71 (66,4%) foram positivas para *Staphylococcus aureus*. Na avaliação de susceptibilidade, foi constatada uma maior sensibilidade à vancomicina, amicacina, teicoplanmina, cefoxitina (100%), cefalotina (98,5%), lincomicina (98,5%), gentamicina (98,2%), oxacilina (96,4%), norfloxacin (95,8%) e sulfazotrim (95,8%), quando comparados à penicilina G (8,5%), tetraciclina (8,4%), ampicilina (90,1%), canamicina (81,7%), eritromicina (88,4%) e cloranfenicol (94,4%), evidenciando alta taxa de resistência às penicilinas e tetraciclina, restringindo o uso no tratamento e profilaxia de infecções estafilocócicas (ZAVADINACK NETO et al., 2001).

A resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos se deve, na maioria das vezes, à produção de penicilinase (beta-lactamase) codificada por plasmídeo. *Tolerância*, uma forma mais rara de resistência a penicilina, atribui-se à carência de enzimas autolíticas da parede celular. Resistência intrínseca à penicilina pode resultar de alterações nas proteínas de ligação a penicilina (enzimas responsáveis pela síntese celular). Resistência a outros antimicrobianos também é muito comum (HIRSH; ZEE, 2003).

2.8.3.4 Patogênese e sinais clínicos

Staphylococcus aureus produz sete enterotoxinas distintas: A, B, C1, C2, C3, D e E. A enterotoxina "A", um superantígeno, corresponde àquela mais freqüente associada à intoxicação alimentar estafilocócica. Os superantígenos estimulam grande número de células "T" que passam a liberar mediadores intracelulares, denominados citocinas, ativando uma resposta inflamatória generalizada no intestino a qual resulta em uma gastroenterite associada a intensa perda de fluidos intestinais. A enterotoxina "A" de *S. aureus* é um pequeno peptídeo, com 30.000 Da de massa molecular, codificado por um gene cromossomal. A clonagem e seqüenciamento

desse gene, o gene *entA*, assim como de vários outros genes de enterotoxinas de *S. aureus*, revelaram que estas são geneticamente relacionadas. Embora o gene *entA* encontra-se no cromossomo bacteriano, as enterotoxinas B e C podem ser classificadas por plasmídeos, transposons ou bacteriófagos lisogênicos (MADIGAN et al., 2004)

Os principais sintomas, os quais ocorrem de uma a seis horas após a ingestão da toxina são náuseas, vômitos, diarréias, dor abdominal, dor de cabeça e câibra muscular. O quadro clínico é relativamente brando, com duração de algumas horas a um dia, podendo, se apresentar severo e requerer hospitalização. Isso ocorre em virtude da quantidade ingerida e da susceptibilidade do indivíduo, incluindo desidratação, cefaléia, sudorese e alteração da temperatura corporal. As mortes são raras, porém, têm ocorrido em crianças e idosos (BENNETT et al., 1999).

As enterotoxinas estafilocócicas também têm participação em outros processos patológicos graves, estando envolvidas em sepSES, osteomielites e na síndrome da angústia respiratória, que é caracterizada por uma disfunção pulmonar quase sempre associada a um processo séptico (MICHELIN, 2003).

2.8.3.5 Medidas preventivas

Alimentos susceptíveis que apresentarem baixas contagens de estafilococos permanecerão livres de enterotoxinas e outros riscos de intoxicação se mantidos abaixo de 4,4°C ou acima de 60°C até serem consumidos. Dentre fatores identificados frequentemente envolvidos em surtos, os cinco mais frequentemente foram: refrigeração inadequada, alimentos preparados com muita antecedência, manipuladores infectados com hábitos de higiene pessoal insuficientes, cozimento ou processamento inadequado e alimentos mantidos sob aquecimento em temperaturas que favoreceram o crescimento bacteriano (JAY, 2005).

Como medida profilática, deve-se evitar os fatores citados acima, armazenar alimentos cuidadosamente, não deixando-os expostos dentro da faixa de temperatura de crescimento dos estafilococos por mais de três a quatro horas. E como os manipuladores de alimentos são os principais disseminadores desse patógeno, é necessário também o conhecimento da microbiota presente nas mãos, pele e fossas nasais desses indivíduos, além do potencial patogênico de cada espécie.

2.9 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Fleming, ao descobrir a penicilina em 1929, observou a resistência natural de microrganismos aos antibióticos, descrevendo que estes não possuíam mais efeito sobre bactérias do grupo coli-tifóide e *Pseudomonas aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*) (FLEMING, 1929). A causa desta resistência natural foi, pouco depois, descoberta por Abraham e Chain, que, em 1940, demonstraram em extratos de *E. coli* uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, a qual denominaram penicilinase. Segundo Livermore (2000a) e Spinosa et al. (2002) a difusão do uso clínico da penicilina trouxe ao conhecimento o fato de que entre microrganismos sensíveis ao antibiótico havia também exemplares resistentes, sendo que no final dos anos 40 o fármaco já não era mais útil no tratamento de pacientes com infecção estafilocócica, e a maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* eram resistentes devido à produção de penicilinase. Desde então, iniciou-se a produção de novas gerações de antimicrobianos e conseqüentemente aparecimento de isolados resistentes.

A resistência aos antimicrobianos é definida como a capacidade adquirida por um organismo de resistir a um agente quimioterápico ao qual este é normalmente susceptível. A maioria das resistências antimicrobianas envolve genes de resistência, que são transferidos por meio de trocas genéticas através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, freqüentemente, envolve genes situados em plasmídeos e transposons. A fim de se proteger, os organismos produtores de antibióticos desenvolvem mecanismos de resistência para neutralizar ou destruir seus próprios antibióticos; os genes codificadores desses mecanismos de resistência podem ocasionalmente ser transferidos a outros organismos (MADIGAN, 2004; SORAINO; PONTE, 1984).

Existem diversas razões para que os microrganismos possam apresentar uma resistência inerente a um antimicrobiano. (1) O organismo pode ser desprovido da estrutura inibida por um antibiótico, como micoplasmas, que não possuem parede celular bacteriana típica, sendo resistente às penicilinas. (2) O organismo pode ser impermeável ao antibiótico, a maioria das bactérias Gram negativas são impermeáveis à penicilina. (3) O organismo pode ser capaz de modificar o antibiótico, que passa a apresentar uma forma inativa. Muitos estafilococos produzem β - lactamases que clivam o anel β -lactâmico da maioria das penicilinas.

(4) O organismo pode modificar o alvo do antibiótico. (5) Alteração da via bioquímica anteriormente bloqueada pelo microrganismo. A sulfonamida inibe a produção de ácido fólico em bactérias e então em bactérias resistentes modificam seu metabolismo, de modo a captarem ácido fólico pré-formado no meio ambiente, evitando a necessidade de realizar a via bloqueada pelas sulfonamidas. (6) O microrganismo pode ser capaz de bombear para fora um antibiótico que está entrando na célula (efluxo) (MANDIGAN, 2004).

A resistência aos fármacos pode ser codificada geneticamente pelo microrganismo, tanto em nível cromossomal, quanto plasmidial, nos denominados plasmídeos de resistência (fatores R). Existe uma variedade de plasmídeos R que conferem resistência múltipla a antimicrobianos na célula receptora. Alguns plasmídeos também contêm genes que permitem à bactéria ser resistente a metais como mercúrio, níquel e cobalto e estes genes estão freqüentemente presentes nos mesmos plasmídeos que carregam genes para resistência a antimicrobianos (CARTER, 1988; LIVERMORE, 2000b).

Pode-se citar determinados genes em bactérias correlacionados à resistência a múltiplos fármacos, como o “operon” “multiple antibiotic resistance” (*marAB*) que confere resistência ao microrganismo para cloranfenicol e tetraciclina e quinolonas. O “operon” *mar* foi primeiramente indentificado em *E. coli* e é prevalente em muitas espécies, incluindo *S. Typhimurium*. O *marR* codifica a ligação da proteína DNA que funciona como um repressor do “operon” *marAB* por ligar-se a região do promotor e prevenir a transcrição deste último gene. A ativação do *marAB* induz a uma variedade de fenótipos, como por exemplo menor expressão de proteínas da membrana externa *OmpF*, e se inibida reduz o influxo na membrana e em seqüência ocorre um aumento na expressão de *AcrAB* e *ToIC* para auxiliar no efluxo (ALEKSHUN; LEVY, 1997, 1999). Segundo Prouty et al. (2004) o “operon” *marAB* é ativado na presença de bile, pois o deoxicolato combina-se com repressor *marR*. E mesmo somente a bile, sem a presença do *marAB*, em doses subletais, induz estirpes de *Salmonella* spp. resistirem a diversos fármacos, isto porque os sais biliares presentes na célula bacteriana ativa a transcrição de *acrAB*, gene responsável pela bomba de efluxo.

A transferência de genes de estirpes multirresistentes de bactérias não-patogênicas ou de baixa patogenicidade para microrganismos patogênicos é um

fenômeno comum e ocorre devido a mobilidade de elementos genéticos, como plasmídeos, transposons e integrons (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

É possível, por exemplo, que a resistência do *Bacteroides fragilis* a tetraciclinas e eritromicina tenha origem, respectivamente, na *Prevotella ruminicola* e no *Bacillus sphaericus*. O primeiro é um anaeróbio do intestino de suínos e carneiros; o segundo é uma bactéria do solo. Este fenômeno natural ganha importância, porém, com a utilização das substâncias antimicrobianas, por sua ação seletora de microrganismos resistentes. O emprego das drogas antimicrobianas em seres humanos e animais possibilitam a disseminação destes microrganismos, que é tanto maior quanto mais intenso for este uso (TAVARES, 2000).

Na medicina veterinária cerca de 87% do emprego dos antimicrobianos são para fins de tratamento, controle e prevenção de doenças em animais. Outros 13% são usados para o aumento da eficácia nutricional, com o ganho de peso como indicador de resposta. Essa prática é proibida no Brasil e em muitos outros países (GRANJA, 2004), porém ocorre em nosso país o uso indiscriminado de antibióticos em criações extensivas, segundo dados do SINDAN (2006), o consumo destes em 2006 com a espécie bovina foi equivalente à R\$1.304.332.383,00.

Em criações de bovinos, onde antibióticos são utilizados ocorre alta pressão de seleção e estirpes genéricas passam a apresentar multirresistência a fármacos (DEFRANCESCO et al., 2004; USDA, 2002) e quanto maior o uso de fármacos, há maior probabilidade para disseminação e manutenção de estirpes salmonelas multirresistentes (DEFRANCESCO et al., 2004). Chandra et al. (2004) ao isolarem o gênero *Salmonella* em vesículas biliares e linfonodos de caprinos obtiveram como resultado 51,67% dos isolados resistentes a multifármacos. Segundo Davis et al. (2007) durante o período de 1986 a 2004, nos Estados Unidos, houve um aumento de 30-80% da resistência de salmonelas isoladas de bovinos aos fármacos: ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, estreptomicina, tetraciclina e sulfonamida. A resistência a multifármacos por *Salmonella* spp. é alarmante para a saúde pública, pois reduz a opção de terapêutica em casos de infecção invasiva em animais e humanos (ZHAO et al., 2007).

A importância do uso de antimicrobianos em animais como elemento de influência no desenvolvimento de resistência microbiana tem sido motivo de

de discussão. Descheemaeker et al. (1999) na Bélgica, estabeleceram alguma identidade de genes de resistência contra glicopeptídeos em *Enterococcus faecium* isolados em suínos e aves e no homem, indicando a possibilidade de troca de marcadores genéticos de resistência entre as espécies. Também Donnelly et al. (1996) e Holzman (1998) relataram diversos aspectos da resistência dos enterococos à vancomicina em países da Europa e Américas, relacionando-a à utilização da avoparcina na alimentação de animais.

Os possíveis riscos à saúde humana decorrentes do emprego de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos podem estar associados aos resíduos dos mesmos em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) recomendados e contribuindo para a seleção de bactérias resistentes a fármacos. Isto pode ocorrer quando o emprego do produto não observa as boas práticas de uso de medicamentos veterinários, em especial as especificações de uso. O conhecimento da dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle visando à proteção do consumidor. Ciente do problema a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo, visa avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio (PAMVET, 2003).

A resistência a antimicrobianos é um tema de extrema importância e vem sendo debatido conjuntamente por diferentes organizações internacionais e todos os interessados neste exercício devem ter a responsabilidade de garantir a segurança na cadeia de alimentos, a eficiência e a viabilidade dos fármacos utilizados em medicina humana e veterinária. Segundo Dehaumont (2004), responsabilidades devem ser compartilhadas por autoridades públicas, indústrias farmacêuticas, farmacêuticos, médicos veterinários e criadores de animais de produção.

Em adição, resistência microbiana a fármacos pode ser direcionada a um novo código apropriado de desenvolvimento de práticas higiênicas. A “World Organization for Animal Health” (OIE), “Food and Agricultural Organization” (FAO) e “World Health Organization” (WHO) realizaram conferências mundiais em Geneve no ano de 2003 e Oslo em 2004 com objetivo de elaborar estratégias de ação para a vigilância de resistência microbiana no futuro (DEHAUMONT, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense – UFF.

3.2 MATERIAL

Foram coletadas aleatoriamente 30 vesículas biliares íntegras de bovinos abatidos em um matadouro frigorífico sob Inspeção Sanitária Estadual, situado na cidade de Barra Mansa, no estado do Rio de Janeiro. Os animais procederam de cidades próximas ao estabelecimento, como Barra do Piraí, Resende e Floriano.

A vesícula biliar foi coletada de animais saudáveis, julgados após inspeção *ante-mortem* e *post-mortem*. Logo, acondicionadas individualmente em frascos plásticos fechados devidamente identificados, submetidos à refrigeração e transportados em bolsas isotérmicas. O processo de análise microbiológica foi iniciado no mesmo dia de obtenção das amostras.

3.3 BACTERIOLOGIA

Foram pesquisadas no líquido e epitélio da vesícula biliar Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM), *Staphylococcus aureus*, Enterobactérias totais, *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *Salmonella* spp.

Os testes para a contagem padrão de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM), isolamento de *Staphylococcus aureus* e contagem de enterobactérias seguiram-se as determinações dos Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água (BRASIL, 2003). Segundo Merck (2000) foram realizadas a enumeração de *Enterococcus* spp. modificado por Franco e Leite (2005) e *E. coli*. A pesquisa de *Salmonella* spp. foi desenvolvida segundo o método descrito por Pignato (1995).

3.3.1 Miniaturização dos procedimentos convencionais

Foram utilizados 0,9 mL de Solução Salina Peptonada a 0,1% para diluição em série em “Eppendorfs” ao invés de 9 mL desta solução. Os meios de cultura foram acondicionados assepticamente no volume de 1mL ao invés de 10 mL, em “Eppendorfs”, no momento de uso. A redução dos volumes das soluções e meios de cultura economizaram em dez vezes as quantidades utilizadas, reduzindo os custos e o tempo de preparo das diluições (FRANCO; MANTILLA, 2004).

3.3.2 Preparo das amostras

Na câmara asséptica, após a sanificação das superfícies, como pisos, paredes, teto e bancada com hipoclorito de sódio a 10%, e posteriormente sanificação da bancada com etanol a 70%, a vesícula foi aberta e fragmentada com o auxílio de instrumental esterilizado e flambado. Foram analisados de cada vesícula, sua parede e o líquido, denominado bile. Para análise do epitélio foi pesado 20 g em balança digital (Marte® modelo AS2000C) e para o líquido, 20 mL de bile foram medidos com auxílio de pipetas esterilizadas. Para cada 10 g de epitélio e líquido biliar foram acrescentados, em um envelope estéril, 90 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% (BRASIL, 2003), e para os outros 10 g correspondente de cada subamostra, 90 mL do Caldo Salmosyst Base (PIGNATO, 1995) para pesquisa de *Salmonella* spp. Os envelopes estéreis foram homogeneizados em homogeneizador vertical (SEWARD® Stomacher 80). Optou-se pela miniaturização dos procedimentos convencionais descrito por Franco e Mantilla (2004), como já re-

ferido anteriormente. A diluição seriada para líquido biliar foi de 10^{-1} a 10^{-3} e para o epitélio da vesícula de 10^{-2} a 10^{-4} , porém para análise de *Enterococcus* spp. e *E. coli* a diluição foi de 10^{-3} a 10^{-5} no epitélio vesical.

Toda a vidraria utilizada no experimento foi esterilizada em forno Pasteur a 170°C por uma hora. As soluções e meio de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave, conforme suas respectivas especificações, assim como o material descartável. A eficácia da esterilização em autoclave foi confirmada com o uso de ampolas Sterikon® bioindicador (MERCK nº 1.10594) que contém caldo nutritivo, indicador de pH e esporos de *Geobacillus stearothermophilus*. As ampolas foram autoclavadas conjuntamente com o material a ser utilizado no experimento. Após a esterilização, as ampolas foram incubadas a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em esterilizações eficientes não há alteração do meio, pois os esporos do referido microrganismo são destruídos; em caso contrário, ocorre a germinação dos esporos que é observada a partir da viragem do indicador para amarelo, pela produção de ácido e turbidez em consequência do crescimento da microbiota padrão (MERCK, 2000).

3.3.3 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM)

Foi semeado 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis onde houve a adição de 20 mL de APC (Himedia® nº M091) fundido e mantido em banho-maria a $46-48^{\circ}\text{C}$. O Ágar e o inóculo foram homogeneizados adequadamente, solidificando em superfície plana. Logo em seguida, foram incubadas as placas de modo invertido, na temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

A partir dos dados obtidos da leitura das placas, foi calculado o número de microrganismos presentes na amostra em análise segundo Brasil (2003), e o resultado expresso em UFC/g e UFC/mL.

Os métodos de CBHAM oferecem o número de microrganismos viáveis na amostra pela utilização do meio de cultivo adequado, de maneira a promover o crescimento do mais amplo espectro de microrganismos presentes na amostra sob análise. Esta amostra pode ser leite, produtos lácteos, água e outros materiais. Alguma seletividade será exercida pela temperatura de incubação. Em muitos casos, como nos produtos processados, a CBHAM indica o nível geral de higiene durante a fabricação, condições de armazenamento e transporte, enquanto em produtos não

processados pode ser indicador da qualidade deste. A precisão do método pode ser limitada pela incapacidade de alguns microrganismos formarem colônias visíveis no meio e condições utilizadas, como também, pela presença de substâncias inibidoras produzidas por microrganismos da própria amostra durante o crescimento no Ágar (BRASIL, 1993; MERCK, 2000).

3.3.4 Contagem de *Staphylococcus aureus*

Sobre a superfície do Ágar Baird-Parker (Vetec® nº 5122) foi semeado 0,1mL de cada diluição, iniciando-se da maior para a menor diluição e com o auxílio do bastão tipo "hockey" espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio. A incubação ocorreu após total absorção da diluição no meio. As placas foram incubadas invertidas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas

A inoculação em Ágar Baird-Parker evidencia a habilidade dos estafilococos crescerem na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5 % de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina. Dessa forma o *Staphylococcus aureus* reduz anaeróbia e aerobiamente o telurito de potássio, produzindo colônias pretas. A suplementação com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente (BRASIL, 2003).

As colônias típicas de *S. aureus* apresentaram as seguintes características: puntiformes, pretas, com halos transparentes, rodeadas por uma zona opaca, brilhantes e convexas. Excepcionalmente, espécies não lipolíticas produzem colônias sem halo de transparência e zona opaca ao seu redor (BRASIL, 2003).

Para as provas complementares, como prova da catalase, coagulase, coloração pelo método de Gram, detecção da atividade da DNase, pesquisa de termonuclease e prova de Hugh-Leifson baseada na oxidação/fermentação da glicose e oxidação/fermentação do manitol foram selecionadas cinco colônias típicas e/ou atípicas

- Prova da catalase

Na prova da catalase, com o auxílio de um bastão de vidro, foi retirada uma alíquota do cultivo em Caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (Himedia® nº210) e transferido para uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio 3%.

Segundo Brasil (2003) a formação de borbulhas indica prova positiva para catalase, característica do *S. aureus*, que possui a enzima com capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio e liberar água e oxigênio. Esta prova é fundamental na separação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

- Prova da coagulase

Para o teste da coagulase, foram transferidas, com auxílio de agulha, cinco colônias típicas e/ou atípicas selecionadas das placas de cultura para tubos contendo 2 mL de Caldo BHI que foram incubados por 18-24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a incubação foi transferido 0,3 mL de cada tubo de cultivo em Caldo BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho e incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. O plasma de coelho utilizado foi o da marca Coagu-plasma Laborclin®.

Esta prova baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo microrganismo. A formação de um coágulo grande e organizado ou a coagulação total foram considerados resultados positivos para a prova; já a formação de coágulo pequeno e desorganizado ou organizado, foi avaliada em conjunto com provas complementares (BRASIL, 2003).

- Coloração pelo método de Gram

A coloração pelo método de Gram foi baseada na verificação das características morfológicas e tintoriais do microrganismo, segundo APHA (2001) modificado por Hucker. Cocos Gram positivos em forma de cachos de uva indica a possível presença de estafilococos. Para a coloração foi utilizada a seguinte técnica:

- 1) Com uma alça de platina transferiu-se o cultivo do Caldo BHI para a lâmina;
- 2) Secou-se o esfregaço sobre a chama do Bico de Bunsen;

- 3) Cobriu-se o esfregaço com a solução cristal violeta por 1 minuto;
- 4) Lavou-se a lâmina com água destilada;
- 5) Adicionou-se o lugol por um minuto;
- 6) Lavou-se a lâmina com água destilada;
- 7) Colocou-se álcool por alguns segundos;
- 8) Lavou-se a lâmina com água destilada;
- 9) Acrescentou-se fucsina durante 30 segundos;
- 10) Secou-se com papel absorvente;
- 11) Observou-se ao microscópio sob imersão.

- Detecção da atividade da DNase

Para a detecção da atividade da DNase, foram transferidos, com o auxílio da alça de platina, os cultivos mantidos em Caldo BHI para placas estéreis contendo Ágar DNase teste base (Himedia® nº M482) e incubados por 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Esta prova consiste na degradação do DNA em oligonucleotídeos pela ação da enzima DNase produzida pelo microrganismo. A reação é evidenciada com a mudança de coloração do meio de azul para púrpura rosa ao redor do crescimento após o gotejamento de solução azul de toluidina a 0,1%. O *Staphylococcus aureus* possui a enzima DNase (BRASIL, 2003).

- Prova da termonuclease

Para a pesquisa de termonuclease, os tubos de cultura mantidos em Caldo BHI foram submetidos à fervura em banho-maria por 15 minutos, logo, inoculados no Ágar DNase teste base (Himedia® nº M482) acrescido de azul de toluidina que continha orifícios equidistantes com cerca de 2 mm de diâmetro e incubados por quatro horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em câmara úmida.

Esta prova consiste em confirmar a termorresistência da enzima DNase produzida pelo microrganismo que degrada o DNA em oligonucleotídeos. A reação é evidenciada pelo aparecimento de um halo de coloração rósea no ágar azul de toluidina e de clarificação, quando utilizado o ágar para teste de Dnase com verde de metila. O *Staphylococcus aureus* é termonuclease positiva (BRASIL, 2003).

- Prova de Hugh-Leifson

Para a prova de oxidação/fermentação da glicose e manitol cada cultivo puro de suspeita do gênero *Staphylococcus* presente em Caldo BHI foi semeado em quatro tubos com 2 mL do meio de Hugh-Leifson (Merck nº10282), onde 2 tubos continham glicose a 1% e o outros dois tubos manitol a 1%. Dois tubos, um contendo manitol e o outro glicose, foram cobertos com uma camada de 1 a 2,5 cm de espessura de Óleo Nujol ®. Os tubos foram incubados a 35°C, por 18-24 horas.

O resultado consiste em verificar a viragem da cor do meio e presença de gás. A cor amarela nos tubos significa fermentação da glicose e manitol. O crescimento somente no tubo sem óleo nujol significa utilização oxidativa da glicose e manitol (BRASIL, 1993). Os estafilococos são anaeróbios facultativos que atacam carboidratos por oxidação e fermentação. A fermentação do manitol diferencia linhagens produtoras de enterotoxinas (JAY, 2005).

3.3.5 Contagem de Enterobactérias

Para a contagem alíquotas das diferentes diluições, líquido e epitélio biliar, foram plaqueadas em duplicadas em placas de Petri estéreis e adicionou-se cerca de 18 a 20 mL do meio "Violet Red Bile Glucose" (VRBG) (Difco nº 218661), sendo esta quantidade suficiente para cobrir a placa em 2mm. Após a vazagem na placa de Petri, o inóculo com o meio foi homogeneizado cuidadosamente e postos em repouso até total solidificação. Logo, adicionou-se uma segunda camada com o mesmo meio e após completa solidificação as placas foram incubadas em posição invertida em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas

O ágar VRBG evidencia, em sua composição, a habilidade dos microrganismos fermentarem a glicose com produção de ácido, reação indicada por uma viragem do indicador a vermelho e a precipitação de sais biliares ao redor das colônias. A seletividade é exercida pela presença de cristal violeta e bile no meio (BRASIL, 2003).

Placas com 15 a 150 colônias foram selecionadas e as colônias de coloração vermelha, rodeadas ou não por halo de precipitação da bile presente no meio, com 0,5 a 2 mm de diâmetro foram contadas. Para as colônias típicas da família

Enterobacteriaceae, após a confirmação morfo-tintoriais pelo método de Gram, realizou-se a identificação bioquímica com os testes de reação de oxidase, prova da redução do nitrato e prova de Hugh-Leifson.

- Teste para reação de oxidase

Utilizando-se a alça de platina espalhou-se a cultura que estava acondicionada em Caldo BHI sobre as tiras de papel com reativo para oxidase (Newprov®), comercialmente disponíveis. A leitura foi realizada em 10 a 20 segundos porque, após este tempo, reações falso-positivas podem ocorrer. O aparecimento de cor azul (N'N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino dimetil-anilina) é indicativo de reação positiva. Todas as enterobactérias apresentam reação de oxidase negativa (BRASIL, 2003).

- Prova da redução do nitrato

As culturas mantida em Caldo BHI foram semeadas para tubos contendo 3 mL de Caldo Nitratado (Merck nº 7.473122) e incubadas por 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após incubação acrescentou-se aos tubos 0,5 a 1 mL de solução de alfa-naftilamina 0,5% e 0,5 a 1 mL de ácido sulfanílico 0,8%.

O aparecimento de coloração vermelha indica a redução do nitrato a nitrito. Para confirmação do resultado negativo, acrescenta-se alguns miligramas de pó de zinco. O aparecimento de uma cor rosa é indicativo da não redução do nitrato, enquanto que a não alteração de cor é indicativa de reação positiva para redução do nitrato. As enterobactérias reduzem nitrato a nitrito (BRASIL, 2003).

- Prova de Hugh-Leifson

Para a oxidação/fermentação da glicose cada cultivo puro de suspeita da família *Enterobacteriaceae* presente em caldo BHI foi semeado em dois tubos com 2 mL do meio de Hugh-Leifson (Merck nº 10282) adicionado de glicose a 1%. Um tubo foi coberto com uma camada de 1 a 2,5 cm de espessura de Óleo Nujol®. Os tubos foram incubados a 35°C , por 18-24 horas.

O resultado consiste em verificar a viragem da cor do meio e presença de gás. A cor amarela nos tubos significa fermentação da glicose. O crescimento somente no tubo sem óleo nujol significa utilização oxidativa da glicose (BRASIL, 1993). Todas as enterobactérias são anaeróbias facultativas e utilizam a glicose por oxidação ou fermentação.

3.3.6 Enumeração de *E. coli*

De cada amostra foi retirada uma alíquota de 100 µL e inoculada em “Eppendorf” contendo 900 µL de solução salina até a obtenção das diluições 10^{-1} a 10^{-3} para a amostra correspondente ao líquido biliar e 10^{-3} a 10^{-5} para o epitélio vesical. Foram semeadas séries de três “Eppendorfs” contendo cada um 1 mL (1000 µL) do meio Fluorocult LMX “Broth Modifiel acc. to Marrafi and Osmer. (Merck nº 1.10620). Estes foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas e após este período realizou-se a leitura e interpretação do teste.

Neste meio de cultivo a alta qualidade alimentícia e o tampão de fosfato garantem um rápido crescimento de coliformes. O lauril sulfato presente inibe as bactérias Gram positivas. A identificação simultânea de coliformes totais e *E. coli* é possível pela adição de substrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosideo (X-GAL), o qual é metabolizado pelos coliformes e produzem uma viragem de cor do meio para verde azulado. O 1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosideo (IPTG) atua como substância intensificadora da síntese enzimática e aumenta a atividade da β-D-galactosidase. O substrato fluorógeno 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo é metabolizado pela enzima β-D-glucoronidase altamente específica para *E. coli*, comprovado pela exposição à luz ultravioleta mediante o aparecimento de fluorescência. O conteúdo triptofano do meio de cultivo melhora a reação do indol, obtida a partir da adição do reativo de Kovac's onde na presença de indol ocorre o desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura indicando prova positiva (MERCK, 2000).

A leitura foi realizada com o auxílio de lâmpada ultravioleta onde os tubos tipo “eppendorfs” positivos para coliformes totais demonstraram uma coloração azul esverdeada, e os positivos para *E. coli*, fluorescência azul esverdeada e indol positivos. Os resultados positivos foram anotados em cada uma das diluições para

sequencialmente realizar o cálculo NMP por mL e g de amostra aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{\text{NMP da tabela} \times \text{fator de diluição intermediário} \times 10 \text{ (fator de correção)}}{100}$$

3.3.7 Enumeração de *Enterococcus* spp.

Segundo técnica modificada do Merck por Franco e Leite (2005), de cada amostra foi retirada uma alíquota de 100 µL e inoculada em “Eppendorf” contendo 900 µL de solução salina até a obtenção das diluições 10^{-1} a 10^{-3} para a amostra correspondente ao líquido biliar e 10^{-3} a 10^{-5} para o epitélio vesical. Foram semeadas séries de três “Eppendorfs” contendo cada um 1 mL (1000 µL) do meio Caldo Chromocult (Merck nº 1.10294). Estes foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas e após este período realizou-se a leitura e interpretação do teste.

No Caldo Chromocult o substrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glicopiranosídeo (X-GLU) é metabolizado, na presença de peptonas, pela enzima β-D-glicosidase que está presente no referido microrganismo. O resultado é uma coloração azul esverdeada intensa no caldo. O meio contém a azida-sódica que inibe o crescimento da microbiota acompanhante, principalmente bactérias Gram negativas, prevenindo um resultado falso-positivo por outras bactérias que contenham a enzima β-D-glicosidase (MERCK, 2000).

Os tubos que apresentam coloração azul-esverdeada, segue-se com o NMP, calculado através da mesma fórmula utilizada para coliformes. A partir dos “Eppendorfs” positivos de cada diluição, inoculam-se as amostras em placas contendo o meio Ágar Chromocult (Merck nº 1.13991), e logo são incubadas a 35°C por 24 - 48 horas e após este período realiza-se a leitura observando as colônias suspeitas, destas são feitas coloração pelo método de Gram para confirmação das características morfo-tintoriais. Cocos Gram positivos em cadeias ou soltos indicam a possível presença de *Enterococcus* spp. Também os resultados negativos nas diversas diluições são confirmados com a coloração pelo método de Gram.

3.3.8 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada segundo técnica descrita por Pignato (1995). Na câmara asséptica, em condição de assepsia, cada vesícula foi aberta e fragmentada com o auxílio de instrumental esterilizado e flambado. Fragmentos do seu epitélio, no total 10 g, e 10 mL do líquido biliar foram pesados.

Para 10 g de epitélio foi acrescentado, em um envelope estéril, 90 mL do Caldo Salmosyst Base. O mesmo procedimento foi repetido para o líquido biliar. Os envelopes estéreis foram homogeneizados em homogeneizador vertical (Stomacher).

O Caldo Salmosyst Base foi preparado no laboratório utilizando a seguinte fórmula segundo método descrito por Pignato (1995):

Peptona universal – 10 g
Cloreto de sódio (NaCl) – 5 g
Carbonato de cálcio (CaCO₃) – 10 g
Água destilada – 1000 mL

O homogeneizado com 90 mL do Caldo Salmosyst Base foi incubado a 37°C por seis horas. Após este período, 10 mL de cada homogeneizado foi transferido para tubo contendo 10 mL de Suplemento Salmosyst e reincubado por 18 horas a 37°C.

O Suplemento Salmosyst também foi preparado no laboratório utilizando a seguinte fórmula:

Tetracionato – 2 g
Bile bovina – 8g
Verde brilhante – 0,07 g
Carbonato de cálcio (CaCO₃) – 10 g
H₂O destilada – 100 mL

O isolamento realizou-se em Ágar Rambach (Merck nº 1.07500), e as colônias típicas, de coloração rósea, após confirmação morfológica pelo método de coloração de Gram, foram submetidas à triagem bioquímica.

- Triagem bioquímica

As placas com colônias suspeitas e confirmadas Gram negativas foram selecionadas e inoculadas em Ágar inclinado “Triple Sugar Iron” – TSI (Isofar® nº 2051). Os cultivos foram então incubados por 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Segundo Brasil (2003) com o crescimento de *Salmonella* spp. no Ágar TSI verifica-se a produção de H_2S e a utilização da glicose, sacarose e lactose. Ocorre a formação de uma coloração amarela na base do tubo pela fermentação da glicose que é indicada pela viragem do indicador vermelho de fenol com a produção de ácido; uma coloração vermelha no ápice, onde a utilização da peptona como fonte de nitrogênio gera radicais alcalinos e o indicador vermelho de fenol então em meio básico permanece vermelho; além de uma cor preta pela redução do tiosulfato de sódio do meio pelo microrganismo, formando H_2S , na fase intermediária.

- Sorologia

Complementarmente, seguiram-se os testes sorológicos utilizando o Soro *Salmonella* Polivalente Somático da Probac do Brasil®, com anti-soro “O”, “Vi” e “H”. O soro polivalente anti-salmonelas é preparado de acordo com os sorotipos de *Salmonella* spp. recomendados por Edwards e Ewing (1972), que aglutina a grande maioria das amostras de salmonelas isoladas comumente do ser humano e de animais.

Na análise das amostras, estas foram ressuspensas em aproximadamente 2 mL de solução salina estéril 0,85%. Em lâmina de vidro, foi depositado separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "O", diretamente do frasco. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão em teste. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura com iluminação sobre fundo escuro em um a dois minutos. A reação positiva apresenta aglutinação somente na mistura cultivo e anti-soro; na reação negativa há ausência de aglutinação em ambas as misturas e na reação não específica ocorre aglutinação em ambas as misturas devendo ser novamente reisoladas em Ágar não-seletivo e submetidas à reação sorológica. (BRASIL, 2003).

3.3.9 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foram seguidas as recomendações prévias do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2005). As estirpes identificadas como *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva permaneceram em meio ambiente e, após 30 minutos, foram semeadas em Ágar Caso (Merck nº 5458) e incubadas a 37°C por 24 horas. Os cultivos com crescimento foram emulsionados com 4 mL de água destilada esterilizada e padronizou-se a suspensão por comparação de turvação ao padrão nº 1 da escala de McFarland: 1 mL de cloreto de bário a 1% com 99 mL de ácido sulfúrico a 1% que corresponde a $3,3 \times 10^8$ microrganismos por mililitro. Após a retirada das placas com Ágar Müller Hinton (Vetec nº 5036) da geladeira, foram estas incubadas a 37°C durante uma hora, e após este tempo foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas antes da semeadura. Para este fim, um suabe esterilizado foi embebido na suspensão e espalhado suavemente na superfície do meio e, após a absorção completa do inóculo, acrescentou-se o Polisensidisc 4x6 DME® utilizando-se de pinça flambada e resfriada; sendo, em seguida, a placa incubada a 37°C por seis horas. A leitura dos resultados foi realizada através da mensuração dos halos de inibição de crescimento bacteriano, com halômetro, e classificados em resistente de acordo com o padrão estabelecido para cada antimicrobiano.

Os antimicrobianos utilizados para verificar a sensibilidade do gênero *Salmonella* foram: amicacina, cefalotina, cefotaxima, ceftadizima, sulfazotrim, aztreonam, cefoxitina, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina. E para o gênero *Staphylococcus*: clindamicina, eritromicina, oxacilina, penicilina G, teicoplanina, vancomicina, aztreonam, cefoxitina, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina.

3.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Para análise estatística, inicialmente, fez-se a transformação da média da contagem obtida para a base logarítmica.

Calculou-se a freqüência de cada microrganismo isolado nas amostras e seguiu-se a análise no teste de Qui-quadrado, com alfa igual a 5%, onde foi observada a significância estatística das diferenças entre as freqüências das bactérias encontradas no líquido e epitélio da vesícula biliar.

Adotou-se também o teste t de Student com alfa igual a 5% no intuito de comparar as diferenças entre as médias populacionais dos microrganismos presentes nos dois ambientes em estudo da vesícula biliar.

O teste exato de Fisher foi utilizado com alfa igual a 5% para testar a correlação de freqüência de resistência aos fármacos no líquido e epitélio vesical.

O Software usado para a análise estatística foi o Statistix 8.1 e Biostat 2.0 e como suporte estatístico, seguiu-se a metodologia descrita por Thrusfield (2003).

4 RESULTADOS

4.1 FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR

Das 30 amostras de vesículas biliares analisadas, 29 apresentaram contaminação por bactérias pesquisadas (Apêndice - seção 8.1). Dos microrganismos estudados, apenas o gênero *Enterococcus* não foi isolado das amostras..

A frequência de isolamento dos microrganismos no epitélio da vesícula biliar foi de 64,03%, enquanto no líquido foi de 35,97% (TABELA 2). Não foi verificada diferença estatística por tipo de microrganismo no líquido e epitélio vesical.

TABELA 2. Frequências de isolamento por tipo bacteriano nas amostras.*
Nº de isolados (%)

Microrganismos isolados da vesícula biliar	Nº de isolados (%)		
	Líquido	Epitélio	Total
<i>Salmonella</i> spp.	16 (11,51)	18 (12,95)	34 (24,46)
BHAM	8 (5,75)	24 (17,27)	32 (23,02)
<i>E. coli</i>	13 (9,35)	21 (15,11)	34 (24,46)
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 (3,60)	14 (10,07)	19 (13,67)
Estafilococos	8 (5,76)	12 (8,63)	20 (14,39)
Total	50 (35,97)	89 (64,03)	139 (100)

* Qui-quadrado ($p > 0,05$).

A frequência de isolamento de *Salmonella* spp. foi de 24,46%, com um pouco mais da metade deste microrganismo presente no epitélio. Outra bactéria Gram negativa isolada com mesma frequência foi a *E. coli*, porém grande parte encontrava-se aderida ao epitélio da vesícula biliar.

A contagem de enterobactérias representou 13,67% de isolados das amostras, prevalecendo maior contagem no epitélio. Em relação à BHAM, a frequência destes microrganismos na vesícula biliar correspondeu à 23,02% , sendo o isolamento que evidenciou maior adesão de bactérias ao epitélio.

A frequência de estafilococos foi considerada elevada, com 14,39% onde 8,63% estavam presentes no epitélio da vesícula biliar e os outros correspondentes 5,76%, no líquido. Provas bioquímicas permitiram a identificação de *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* coagulase positiva presentes no líquido e epitélio vesical. No líquido biliar a maior porcentagem de estafilococos encontrada correspondeu ao *Staphylococcus* coagulase positiva e no epitélio ao *Staphylococcus* coagulase negativa (FIGURAS 5 e 6).

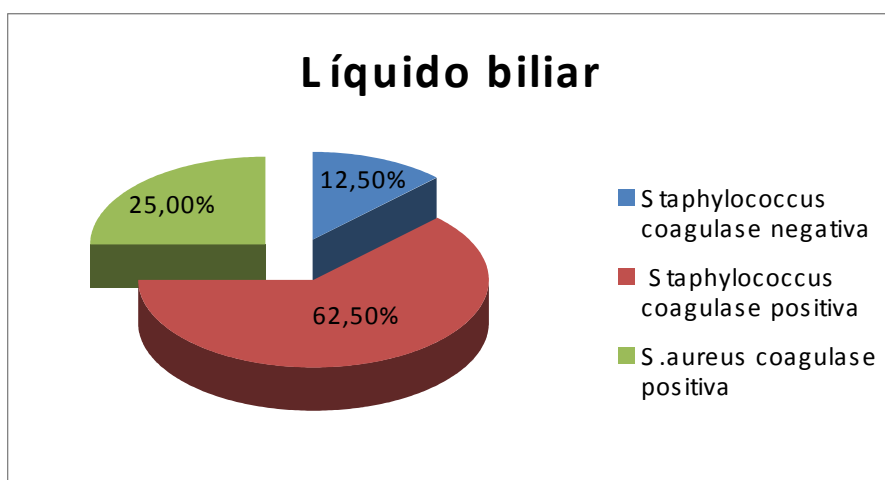


FIGURA 5. Frequência relativa (%) do isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *S.aureus* coagulase positiva no líquido biliar.

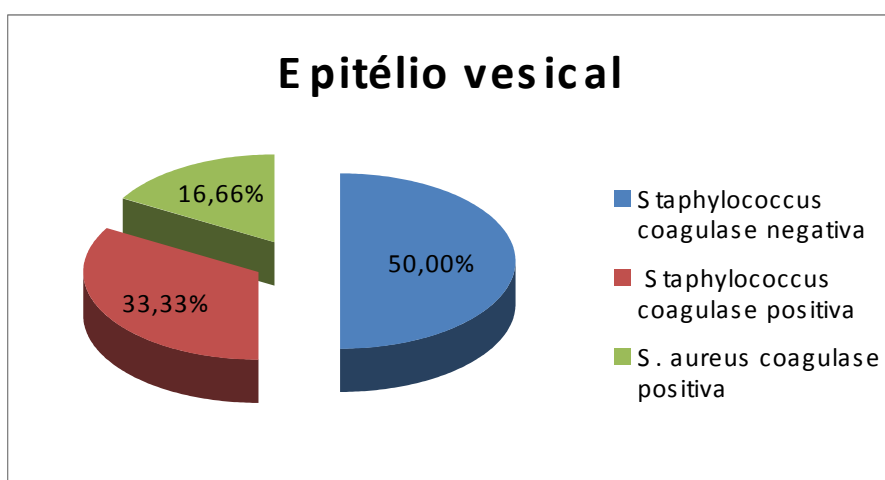


FIGURA 6. Frequência relativa (%) do isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *S.aureus* coagulase positiva no epitélio vesical.

4.2 MÉDIA DAS CONTAGENS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR

Em relação às contagens, houve variação entre o valor encontrado para o epitélio e o líquido (TABELA 3), prevalecendo maior média para o epitélio da vesícula biliar. Aplicando o teste t de Student, foi possível constatar diferença significativa entre as médias populacionais em UFC/g e UFC/mL dos microrganismos presentes nos dois ambientes da vesícula biliar.

Destaca-se com maior média no epitélio vesical Bacterias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM) e a família *Enterobacteriaceae*.

TABELA 3. Média da contagem dos microrganismos presentes no líquido e epitélio da vesícula biliar. *

Microrganismo	Média da contagem no líquido (UFC/mL)	Média da contagem no epitélio (UFC/g)
BHAM	$1,8 \times 10^3$ ^a	$2,9 \times 10^6$ ^b
<i>E. coli</i>	$1,2 \times 10^3$ ^a	$2,4 \times 10^5$ ^b
<i>Enterobacteriaceae</i>	$4,7 \times 10^3$ ^a	$1,0 \times 10^6$ ^b
Estafilococos	$5,2 \times 10^3$ ^a	$5,8 \times 10^5$ ^b

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade foi realizado para *Salmonella* spp. e o gênero *Staphylococcus*.

4.3.1 *Salmonella* spp.

Estirpes de salmonelas isoladas de 16 amostras de líquido biliar (Apêndice – Quadros 10 e 11) e 18 amostras de epitélio vesical (Apêndice – Quadros 12 e 13) foram avaliadas frente ao teste de sensibilidade a antimicrobianos.

No teste de sensibilidade a antimicrobianos, estirpes de *Salmonella* spp. apresentaram maior resistência tanto no líquido quanto no epitélio vesical aos antimicrobianos: cefalotina, sulfazotrim e ampicilina (TABELA 4). No epitélio vesical,

maior sensibilidade ocorreu com os fármacos: cefotaxima, ceftadizima e aztreonam; e no líquido, sensibilidade maior foi ao aztreonam.

A frequência de resistência a cada fármaco no líquido e epitélio vesical (TABELA 4) não foi estatisticamente significativa no teste exato de Fisher ($p < 0,05$), em exceção a droga cefotaxima que apresentou $p = 0,01$.

TABELA 4. Porcentagem de estirpes de *Salmonella* spp. isoladas do líquido e epitélio da vesícula biliar de bovinos resistentes a antimicrobianos.

Antimicrobianos	Líquido biliar (n=16)	Epitélio vesical (n=18)	P-valor ^a
Amicacina	37,50	33,33	1,00
Ampicilina	81,25	66,66	0,44
Cefalotina	93,75	94,44	1,00
Cefotaxima	62,50	16,66	0,01
Ceftadizima	37,50	16,66	0,24
Sulfazotrim	93,75	66,66	0,09
Aztreonam	25,00	16,66	0,68
Cefoxitina	68,75	61,11	0,72
Ceftriaxona	37,50	33,33	1,00
Cloranfenicol	50,00	33,33	0,48
Gentamicina	62,50	55,55	0,73
Tetraciclina	68,75	50,00	0,31

^a Teste exato de Fisher.

Ao também comparar a frequência de multirresistência a fármacos entre líquido e epitélio de uma mesma vesícula com isolados de salmonelas nos dois ambientes (TABELA 5) pelo mesmo teste, não houve diferença estatística.

TABELA 5. Número de fármacos que *Salmonella* spp. isoladas no líquido e epitélio de uma mesma vesícula biliar apresentaram resistência.

Amostra	Líquido biliar	Epitélio Vesical	P-valor ^a
4	12	9	0,21
5	7	10	0,37
8	7	2	0,08
10	5	2	0,37
13	10	7	0,37
16	6	7	1,00
17	4	4	1,33
25	5	5	1,31
27	5	4	1,00
28	6	6	1,00
30	8	5	0,41
Média	6,81	5,54	---- ^b

^a Teste exato de Fisher.

^b Valor não calculado.

Foi constatada a presença de salmonelas multirresistentes (FIGURA 7), onde pelo menos duas estirpes foram resistentes aos 12 fármacos testados, uma isolada do líquido (vesícula biliar de número 4- Apêndice – Quadro 10 e 11) e outra do epitélio vesical (vesícula biliar de número 6 –Apêndice- Quadro 12 e 13). Algumas estirpes no líquido ainda foram resistentes a 11, 10, 8, 7, 6, 5, 4 e 3 fármacos e no epitélio a 10, 9, 7, 6, 5, 4, 3 e 2 fármacos.

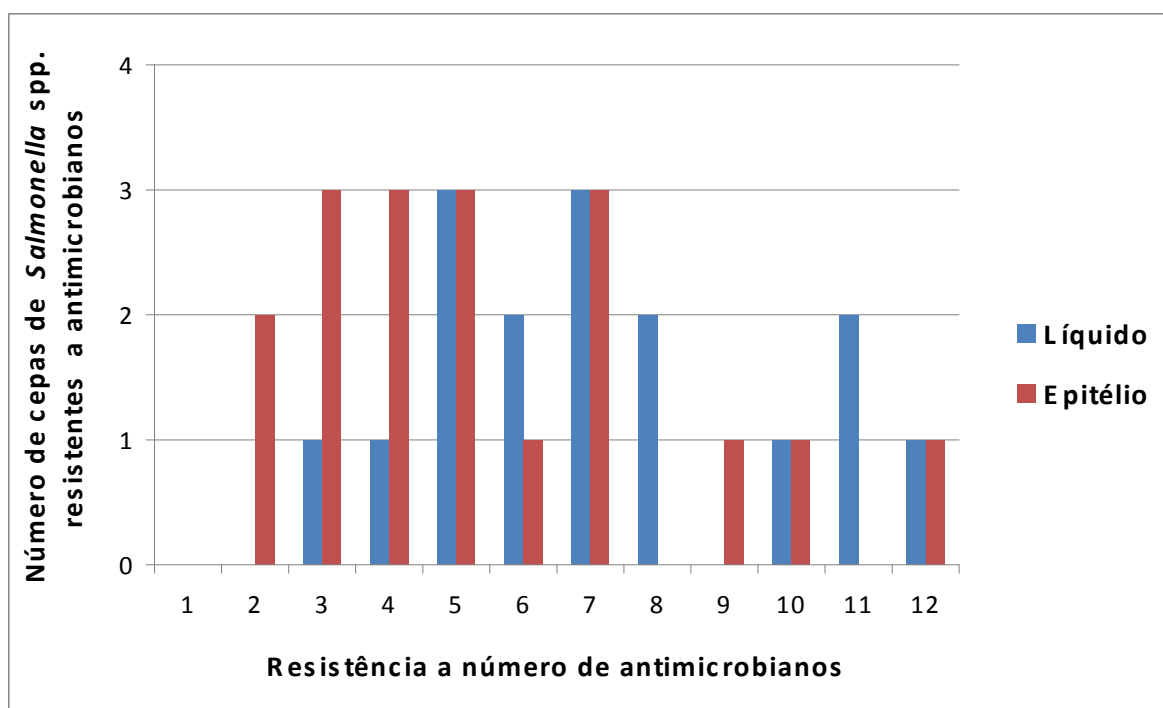


FIGURA 7. Número de estirpes de *Salmonella* spp. resistentes a multifármacos isoladas de líquido biliar e epitélio vesical de bovinos.

4.3.2 Gênero *Staphylococcus*

O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado no gênero *Staphylococcus* isolado de oito amostras de líquido biliar (Apêndice – Quadros 14 e 15) e 12 amostras de epitélio vesical (Apêndice – Quadros 16 e 17).

O gênero *Staphylococcus*, no teste de sensibilidade a antimicrobianos, apresentou as maiores taxas de resistência ao antimicrobiano aztreonam tanto no líquido quanto no epitélio vesical (TABELA 6). No líquido, as estirpes ainda obtiveram maior taxa de resistência em relação à eritromicina e cefoxitina. Quanto à sensibilidade, os dois ambientes da vesícula biliar foram extremamente sensíveis a

penicilina G, ceftriaxona, cloranfenicol e gentamicina. No líquido, o gênero também apresentou total sensibilidade aos fármacos oxacilina e clindamicina e no epitélio: teicoplanina e vancomicina.

A frequência de resistência a cada fármaco no líquido e epitélio foi estatisticamente significativa no teste exato de Fisher para a eritromicina, teicoplanina, vancomicina e cefoxitina. Maior resistência aos antimicrobianos eritromicina, teicoplanina, vancomicina e cefoxitina foi conferida no líquido biliar.

TABELA 6. Porcentagem de estirpes do gênero *Staphylococcus* isoladas do líquido e epitélio da vesícula biliar de bovinos resistentes a antimicrobianos.

Antimicrobianos	Líquido biliar (n=8)	Epitélio vesical (n=12)	P-valor ^a
Clindamicina	0	16,66	0,49
Eritromicina	87,50	25,00	0,01
Oxacilina	0	8,30	1,0000
Penicilina G	0	0	----*
Teicoplanina	37,50	0	0,04
Vancomicina	50,00	0	0,01
Aztreonam	87,50	91,66	1,00
Cefoxitina	87,50	33,33	0,02
Ceftriaxona	0	0	----*
Cloranfenicol	0	0	----*
Gentamicina	0	0	----*
Tetraciclina	75,00	50,00	0,37

^a Teste exato de Fisher

* Não calculado. Estirpes sensíveis nos dois ambientes.

Ao também comparar a frequência de multirresistência a fármacos entre líquido e epitélio de uma mesma vesícula com isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva nos dois ambientes (TABELA 7), pelo mesmo teste, não houve diferença estatística.

Tabela 7. Número de fármacos resistentes para estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa (19) e *Staphylococcus* coagulase positiva (23) isoladas no líquido e epitélio de uma mesma vesícula biliar.

Amostra	Líquido biliar	Epitélio vesical	P-valor ^a
19	5	4	1,00
23	7	2	0,08
Média	6,00	3,00	---- ^b

^a Teste exato de Fisher

^b Valor não calculado.

Em relação à multirresistência, nenhuma cepa do gênero *Staphylococcus* foi resistente aos 12 antimicrobianos, apresentando no máximo, uma cepa resistente a sete fármacos no líquido biliar e duas resistentes a cinco fármacos no epitélio vesical (FIGURA 8).

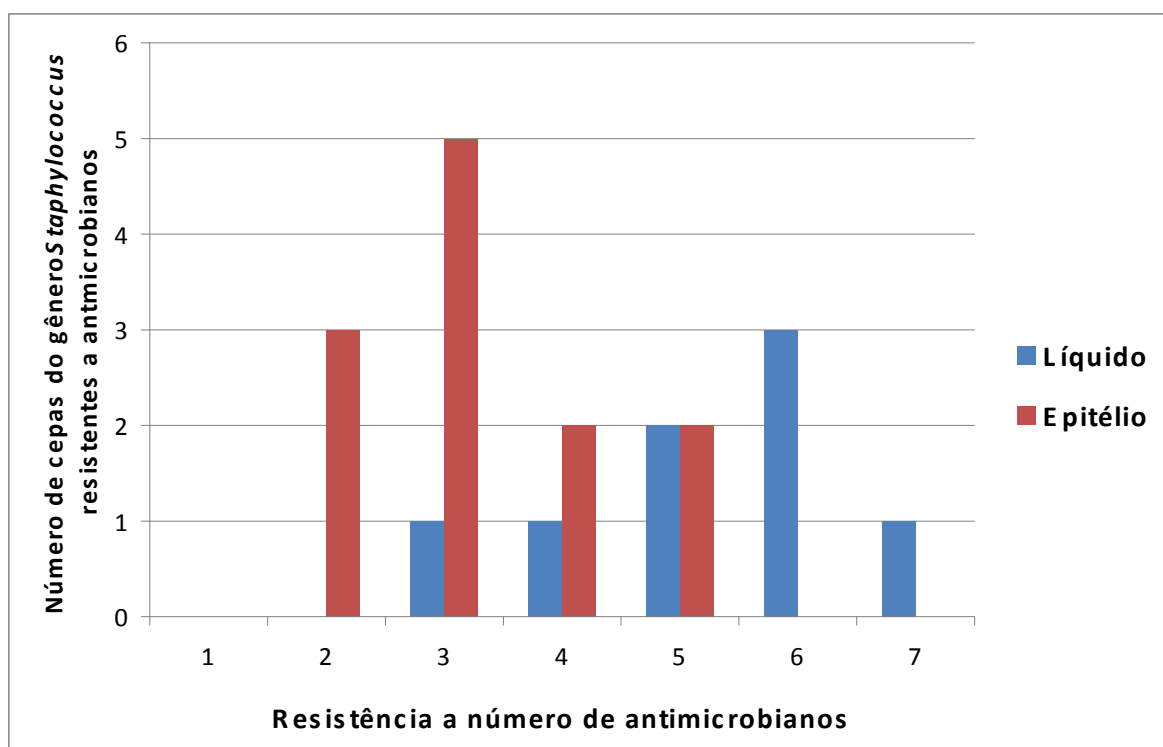


FIGURA 8. Número de estirpes do gênero *Staphylococcus* resistentes a multifármacos isoladas de líquido biliar e epitélio vesical de bovinos.

5 DISCUSSÃO

5.1 FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR

Os mecanismos adaptativos que os microrganismos desenvolvem para sobreviver em locais inóspitos com variações de pH, alta osmolaridade, limitação de nutrientes entre outros permitem a colonização diversificada em vários ambientes, como na presente pesquisa, onde se constatou a sobrevivência de microbiota na vesícula biliar, tanto no líquido como no epitélio vesical.

Embora a frequência de microrganismos tenha sido mais elevada no epitélio vesical, na análise estatística não houve diferença significativa entre os valores obtidos nos dois ambientes da vesícula biliar, sugerindo então um ambiente comum, tanto no líquido quanto no epitélio, para o isolamento de microrganismos. Hancke et al. (1986) afirmaram que o isolamento de bactérias no líquido biliar sempre coincide com a presença de bactéria no epitélio, mas estas no epitélio são mais freqüentemente isoladas. Também Paelke et al. (1989) relataram a existência de um mesmo grupo de microrganismos no líquido e epitélio, e frequência maior no epitélio. Sakurai et al. (1992) descreveram a presença de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* aderidas ao epitélio de 32 pacientes que apresentavam cultura negativa do líquido biliar, este fato tem sido corroborado por outros autores (Andrews; Henry, 1935; Edlund et al., 1959; Flemming et al., 1967; Mason, 1968; Osler, 1907; Watson, 1969).

Como existe vasta literatura científica descrevendo mecanismos de resistência de enterococos para sobreviverem à ação da bile, no presente trabalho pesquisou-se a existência desta referida bactéria no ambiente vesical, porém esta bactéria não foi encontrada. Justamente, estas bactérias poderiam estar

presentes apenas na microbiota intestinal dos bovinos no qual a vesícula biliar foi retirada para estudo. Além disso, os bovinos eram clinicamente saudáveis, não havendo indício de contaminação na inspeção *post-mortem*. Conforme Noskin et al. (1991) e Schaberg et al. (1991) os enterococos fazem parte normalmente da microbiota intestinal, porém podem ser responsáveis por sérias infecções como endocardite, meningite, infecção intra-abdominal e urinária entre outras.

Para Bactérias Heterotróficas Aeróbias mesófilas (BHAM) foram obtidas freqüência de 23,02%. Este resultado indica que a vesícula biliar pode ser um nicho para microrganismos patogênicos, geralmente mesófilos e indica que cuidados devem ser dispensados com o órgão para não contaminar o fígado.

Salmonella spp. e *E. coli*, representantes da família *Enterobacteriaceae*, foram as bactérias isoladas com maior freqüência na vesícula biliar. A adaptação de bactérias Gram negativas na vesícula biliar envolve uma série de mecanismos moleculares como descrito na literatura, a começar pela síntese de um LPS. Embora não haja muitos relatos da avaliação microbiológica da vesícula biliar em bovinos, Stoffregen e Nystrom (2004) afirmam que esta é um bom indicador para a existência ou não de infecção por *E.coli* O157: H7, pois abriga a bactéria. Contrepolis et al. (1986) observaram, como resultado da infecção experimental de *E. coli* septicêmica em bezerros, lesões na vesícula biliar. Onyekaba e Njoku (1986), após análise de 300 amostras de bile de bovinos adultos, coletadas assepticamente de matadouros-frigoríficos, constataram a presença de *E. coli* em 30% das amostras. Jeong et al. (2006) coletaram vesículas biliares de bovinos em abatedouros e das 150 amostras de bile testadas, *E. coli* O157:H7 foi isolada de quatro amostras (2,7%). Afirmaram também que ao inocularem *E. coli* O157:H7 em 23 bovinos, 13 animais apresentaram a bactéria na vesícula biliar, demonstrando que este organismo pode residir permanentemente na vesícula biliar.

A freqüência do gênero *Staphylococcus* foi considerada elevada nesta pesquisa. Foi constatada a presença de *S. aureus* coagulase positiva, microrganismo capaz de produzir toxinas termoestáveis. Este resultado permite o questionamento da base teórica que sais biliares são inibidores de bactérias Gram positivas, como estafilococos e *Listeria* spp., e até utilizados em meios bacteriológicos como componente seletivo para microbiota Gram negativa. Embora neste trabalho não tenha analisado a presença de *Listeria* spp. há relatos da existência desta bactéria na vesícula descrito por Begley et al. (2006) e Conger

(2004).

A presença do gênero *Staphylococcus* na vesícula biliar e sua resistência à ácidos biliares vem sendo descrita por muitos pesquisadores. Ohtomo et al. (1981) e Liao e Hash (1977) relataram a presença de taurina no encapsulamento e superfície do antígeno em *S. aureus*, respectivamente. Varaldo et al. (1984) descreveram a presença de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus warneri* em líquido biliar. Petakovic et al. (2002), Merchant e Falsey (2002) e Garcia-Lechuz et al. (2003) mencionaram a presença de estafilococos em vesículas biliares e a correlação com colecistite.

Neste estudo, o maior número de isolados no líquido biliar de bovino correspondeu a *Staphylococcus* coagulase positiva. Porém, Kawecky et al. (2007) ao analisarem a bile de pacientes humanos que foram submetidos a transplante de fígado, concluíram que das 210 amostras de bile coletadas, 110 amostras apresentaram cultura bacteriana positiva. As espécies mais comumente isoladas foram cocos Gram positivos, 109 isolados, prevalecendo em 52% *Staphylococcus* coagulase negativa no líquido biliar. Na presente pesquisa, *Staphylococcus* coagulase negativa prevaleceu no epitélio vesical.

5.2 MÉDIA DE CONTAGEM DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DA VESÍCULA BILIAR

Dos microrganismos contados, enumerados e pesquisados na vesícula biliar, todos obtiveram maior contagem no epitélio vesical. Na análise estatística houve diferença significativa entre as médias populacionais em UFC/g e UFC/mL dos microrganismos presentes no líquido e epitélio vesical. Maiores UFC no epitélio permitiu a conclusão da diferença nos dois ambientes.

Embora o ambiente seja comum para isolamento das bactérias, é no epitélio onde se encontram os microrganismos com maior frequência e maior contagem. Mediante o resultado e análise estatística deste estudo é possível que a permanência do microrganismo na vesícula ocorra devido a sua aderência ao epitélio, sendo este seu “habitat”, porém em consequência da contratilidade do órgão, ocorre o desprendimento de bactérias do epitélio e migração para o líquido. Segundo Kosowski et al. (2000) isolados de bactérias do líquido biliar indica

lesão na mucosa por adesão, agregação destes microrganismos no epitélio vesical.

5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana é de extrema importância na clínica médica e também chama a atenção para cuidados à criação de bovinos, evitando o uso de antimicrobianos, pois são evidentes as consequências à saúde pública, uma vez que ocorre transmissão horizontal de estirpes multirresistentes através dos alimentos de origem animal aos humanos, acarretando maiores dificuldades em tratar a doença ao limitar o número de fármacos efetivos contra o microrganismo, elevando assim a taxa de mortalidade em surtos de doenças veiculadas por alimento.

5.3.1 *Salmonella* spp.

No teste de sensibilidade a antimicrobianos realizado nesta pesquisa, com estirpes de *Salmonella* spp. presentes na vesícula biliar de bovinos, foi observado que o fármaco de escolha para o controle de salmonelose nestes animais é o aztreonam. Chandra et al. (2005) ao isolarem espécies de salmonelas na vesícula biliar e linfonodos mesentéricos de caprinos também constataram ser o aztreonam efetivo contra a maioria dos serovares. Condon et al. (1986) indicaram o uso de aztreonam para impedir a colonização de *Enterobacteriaceae* em alterações anatômicas e funcionais da vesícula biliar em humanos, onde em seis horas a Concentração Mínima Inibitória (MIC) da droga foi efetiva em 90% aos membros da referida família.

Salmonelas foram resistentes, nos dois ambientes em estudo da vesícula biliar, aos fármacos: cefalotina, sulfazotrim e ampicilina. O elevado percentual de resistência à cefalotina era esperado, pois segundo Spinoso (2002) trata-se de uma cefalosporina de 1º geração com menor atuação sobre Gram negativas. Em relação ao antimicrobiano ampicilina, Zhao et al. (2007) analisando 129 bovinos mortos, constataram que 66% das estirpes de salmonelas foram resistentes ao referido fármaco. Davis et al. (2007) relataram que entre o período de 2001 a 2004, 79,6% de

S. Dublin isoladas de 48 bovinos apresentaram resistência a ampicilina e 32,7% à sulfa-trimetoprim.

A resistência dos microrganismos à ação de cada fármaco nesta pesquisa, não apresentou, no geral, diferença na análise estatística, no líquido e epitélio vesical, somente em relação ao fármaco cefotaxima, onde maior resistência ao medicamento foi conferida no líquido biliar, sendo o fármaco mais efetivo no epitélio vesical. Não houve também correlação entre a frequência de multirresistência a fármacos no líquido e epitélio, mesmo no líquido ocorrendo maior média de resistência aos fármacos que no epitélio vesical.

No líquido, algumas bactérias podem às vezes, obter maior resistência a um fármaco por estar em contato diretamente com a bile, e não, agregadas ao epitélio de forma a constituir uma camada de proteção a microbiota. Assim, o contato direto acarreta em alterações genotípicas, como no caso de *Salmonella* spp. que, segundo Prouty et al. (2004) os sais biliares induzem nesta bactéria a expressão de genes que ativam a bomba de efluxo que expõem a bile e conseqüentemente os antimicrobianos.

No presente estudo, constatou-se a presença de estirpes multirresistentes, onde duas estirpes, uma no líquido e outra no epitélio, foram resistentes a 12 antimicrobianos. É um dado preocupante, principalmente ao analisar a situação em nosso país que apresenta gastos exorbitantes com antimicrobianos para bovinos. Segundo DeFrancesco et al. (2004) em fazendas onde a pressão de seleção é alta, devido a uso de fármacos, há maior probabilidade para disseminação e manutenção de estirpes de salmonelas multirresistentes.

A resistência a multifármacos por *Salmonella* spp. é alarmante para a saúde coletiva, pois reduz a opção de terapêutica em casos de infecção invasiva em animais e humanos.

5.3.2 Gênero *Staphylococcus*

Os fármacos: penicilina G, ceftriaxona, cloranfenicol e gentamicina são antimicrobianos eficientes para estirpes de estafilococos presentes em vesícula biliar de bovinos, conforme dados encontrados na literatura mundial. Neste estudo, todas as estirpes, tanto no líquido quanto no epitélio, foram sensíveis aos fármacos

mencionados. Corroborando com o trabalho, Petakovic et al. (2002), que embora retratado em humanos, mas em relação ao mesmo objeto de estudo: a vesícula biliar, recomendaram ceftriaxona como tratamento para pacientes com colecistite aguda, estando presente neste processo inflamatório bactérias como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Staphylococcus* spp. Também Hageman et al. (2001) indicaram como tratamento para estirpes de *Staphylococcus aureus* presentes em vesícula biliar de paciente com complicada colecistectomia, o fármaco gentamicina. Porém, quanto a penicilina G, Varaldo et al. (1984) isolou estirpes de estafilococos no líquido biliar de humanos resistentes a este fármaco.

Neste estudo, também foi conferida a sensibilidade do gênero *Staphylococcus* no líquido biliar à oxacilina, diferindo do resultado encontrado por Hageman et al. (2001), onde estirpes de *Staphylococcus aureus* foram resistentes ao fármaco.

No epitélio, estirpes do gênero *Staphylococcus* apresentaram sensibilidade também à teicoplanina e vancomicina. Em relação ao último fármaco, segundo Varaldo et al. (1984) estirpes de estafilococos na vesícula biliar apresentaram menor resistência.

Na presente pesquisa, diferentemente das salmonelas, os estafilococos foram resistentes ao aztreonam no líquido e epitélio vesical. De acordo com Livermore (2000b) alguns grupos bacterianos contêm plasmídeos que inicialmente codificavam produção de beta-lactamases contra ampicilina e cefalosporina de 1º geração, mas por meio de mutações, passaram a codificar a enzima com ação em cefalosporina em geral e aztreonam. Em concordância, Soraino e Ponte (1984) descreveram que já na década de 80 ocorria a susceptibilidade de aztreonam à beta-lactamase produzida por *E. coli* e *Bacteroides* spp.

Quanto à presença de estirpes multirresistentes, os estafilococos, igualmente ao gênero *Salmonella*, obtiveram no líquido biliar resistência a um número maior de fármacos que estirpes presentes no epitélio, mas estatisticamente não foi significativo. Já a frequência de resistência a cada fármaco no líquido e epitélio foi estatisticamente significativa, havendo correlação. Estirpes estafilocócicas presentes no epitélio foram mais susceptíveis aos fármacos: eritromicina, teicoplanina, vancomicina e cefoxitina. Devido ao fato das bactérias estarem agregadas em maior número em um determinado local, pode estar ocorrendo um reduzido nível metabólico das células devido à baixa disponibilidade de nutrientes conforme

relatado por Cloete (2003), o que se adequa à vesícula biliar, e se torna um fator interferente na resistência a antimicrobianos da população.

Como ainda há muito a se estudar sobre os mecanismos genéticos que permitem os microrganismos, principalmente Gram positivos, sobreviverem à ação da bile e ainda resistirem aos antimicrobianos, os dados obtidos neste estudo apenas mostram um caminho a se explorar sobre a adaptação de microrganismos em ambientes nada favoráveis e também alertar para o fato de que o bovino possa ser um portador persistente de patógenos de grande importância em saúde coletiva. Assim cuidados redobrados devem ser exigidos do serviço veterinário oficial quanto ao exame do fígado e vesícula biliar, assim como o rompimento da vesícula durante o abate para evitar a transmissão de agentes etiológicos de origem animal para pessoas e outros animais via cadeia alimentar.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pôde-se concluir que:

- Vesícula biliar de bovino, apesar de condições adversas, albergam microrganismos de importância para a saúde coletiva;
- Estavam presentes tanto no líquido quanto no epitélio os seguintes microrganismos contados, enumerados e pesquisados: Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas, família *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Salmonella* spp. e ausente o gênero *Enterococcus* ;
- Os microrganismos encontrados no líquido biliar corresponderam aos microrganismos encontrados no epitélio vesical;
- O líquido biliar não foi tão eficiente para a inibição de microrganismos Gram positivos, uma vez que estes fazem parte da microbiota vesical;
- A população de microrganismos na vesícula biliar foi maior no epitélio vesical que em relação ao líquido biliar;
- Alguns fármacos foram mais efetivos contra *Salmonella* spp. e o gênero *Staphylococcus* quando estes estavam aderidos ao epitélio vesical;
- Estirpes de *Salmonella* spp. e o gênero *Staphylococcus* apresentaram maior média de resistência aos diversos fármacos quando presentes no líquido biliar;

- Na vesícula biliar estirpes de *Salmonella* spp. foram resistentes aos doze antimicrobianos testados, caracterizando a multirresistência antimicrobiana;
- Para *Salmonella* spp. o antimicrobiano de escolha foi o aztreonam e para o gênero *Staphylococcus* foram: penicilina G, ceftriaxona, cloranfenicol e gentamicina;
- O Serviço de Inspeção Oficial deve rever novos procedimentos para a técnica usual da compressão da vesícula biliar (exame tátil), a fim de evitar o derramamento de bile sobre a superfície do fígado;
- Os funcionários da sala de abate devem ser conscientizados para serem cuidadosos na pesquisa cálculos biliares e também durante a evisceração como um todo, para evitar o rompimento da vesícula biliar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. A enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, n. 146, p. 83, 1940.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S.B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 2067–2075, 1997.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S.B. The *mar* regulon multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends microbiology*, v.7, p. 410-413, 1999.

ANDREWS, E.; HENRY, L. D. Bacteriology of normal and diseased gallbladders. *Archives of Internal Medicine*, v.56, p.1171-88, 1935.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. 2001. 676 p.

BARROS, V.R.M.; PAVIA, P.C.; PANETTA, J.C. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n.94, p.15-19, 2002.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.12, p. 6005-6012, 2002.

_____; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. *Microbiology Reviews*, v.29, p.625-651, 2005.

_____; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n.3, p. 1729–1738, 2006.

BENNETT, R.W.; NOTERMANS, S.; TATINI, S. R. Staphylococcal enterotoxins. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSA, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Inspeção de carnes; padronização de técnicas, instalações e equipamentos*. Brasília, DIPOA/DICAR, 1971.

_____, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101 de 11 de agosto de 1993. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.11937, 17 ag. 1993. Seção 1.

_____, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.6, 05 abr. 2003. Seção 1.

_____, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Eletrônico Epidemiológico - Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2005*. Ano 5, nº 06, 28 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 30 de novembro de 2007.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. *Revista Médica de São Paulo*, v. 5, 6, n. 2, p. 265-278, 1902.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. Jawetz, Melnick & Adelberg's: *Microbiologia médica*. 21. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

CABRAL, D.J., SMALL, D.M., LILLY, H.S.; HAMILTON, J.A. Transbilayer movement of bile acids in model membranes. *Biochemistry*, v. 26, p. 1801–1804, 1987.

CAFFER, M.I; EIGHER, T. *Salmonella enteriditis* in Argentina. *Internacional Journal Food Microbiology*, v.21, p.15-19, 1994.

CAREY, M.C.; DUANE, W.C. *Enterohepatic circulation in: the liver: biology and pathobiology*. New York, Raven Press Ltd, p. 719-738, 1994.

CARTER, G. R. *Fundamentos da bacteriologia e micologia veterinária*. 1. ed. São Paulo: Editora Rocca, 1988. 249 p.

CEE. COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA. *Regulamento (CEE) nº 2084/91, relativo à classificação de certas mercadorias na nomenclatura combinada*. 12 de julho de 1991. Disponível em: < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriSer.do?uri=CELEX:31991R2084:PT:NOT>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2007.

CHAI, T.J.; FOULDS, J. *Escherichia coli* k-12 tof mutants: alterations in protein composition of the outer membrane. *Journal of Bacteriology*, v.130, p. 781–786, 1977.

CHANDRA, M.; SINGH, B.R.; SHANKAR, H.; AGARWAL, M.; AGRAWAL, R.K.; SHARMA, G.; BABU, N. Study on prevalence of Salmonella infection in goats. *Small Ruminant Research*, p.1-7, 2005.

CHOU, C.C.; CHENG, S.J. Recovery of low-temperature stressed *E. coli* O157:H7 and its susceptibility to crystal violet, bile salt, sodium chloride and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 127–136, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI/NCCLS document M100-S15. ISBN 1-56238-556-9.2005. Disponível em:< www.clsi.org>. Acesso: 16 de março de 2007.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.51, p. 277-282, 2003.

CODY, S. H.; ABBOTT, S. L.; MARFIN, A. A.; SCHULZ, B.; WAGNER, P.; ROBBINS, K.; MOHLE-BOETANI, J. C.; VUGIA, J. D. et al. Two outbreaks of multidrug-resistant Salmonella serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. *Journal of the American Medical Association*, v.281, p.1805-1810, 1999.

COLMER J.A., FRALICK J.A., HAMOOD A.N. Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholera*. *Molecular Microbiology*, n. 27, p. 63–72, 1998.

CONDON, R.E.; FRIEDHOFF, L.T.; EDMISTON, C.E.; LEVINSON, B. Aztreonam concentration in abdominal tissues and bile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 29, n.6, p. 1101-1103, 1986.

CONGER, K. *Lingering bacteria may pose future food poisoning risks*. Stanford Report, 11 de fevereiro de 2004. Disponível em: <[www.news-service.stanford.edu/news/medical/2004/February 11/bacteria.html](http://www.news-service.stanford.edu/news/medical/2004/February%2011/bacteria.html)>. Acesso em: 29 de maio de 2006.

CONTREPOIS, M.; DUBOURGUIER, H.C.; PARODI, A.L.; GIRARDEAU J. P.; OLLIER, J. L. Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Veterinary Microbiology*, v.12, n.2, p. 109-118, Jul. 1986.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, W.C. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 843 p.

CORREIA, L.; PODEVIN, P.; BORDERIE, D.; VERTHIER, N.; MONTET, J. C.; FELDMANN, G.; POUPON, R.; WEILL, B.; CALMUS, Y. Effects of bile acids on the humoral immune response: A mechanistic approach. *Life Sciences*, n. 69, p. 2337–2348, 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. *Patologia estrutural e funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. 1277p.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. *Síndrome hemolítico-urêmica e E.coli O157:H7- 1998 - 2006*. Julho de 2007. Disponível em:<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm>. Acesso em: 19 de dezembro de 2007.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. *Staphylococcus aureus* e intoxicação alimentar. Março de 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 18 de novembro de 2007.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, v. 24, p.11-31, 1994.

DAVIS, M.A.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T.E; DANIELS, J.B.; BAKER, K. N. K.; CALL, D.R. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovar Dublin isolates from beef and dairy sources. *Veterinary Microbiology*, v.119 , p.221–230, 2007.

DEFRANCESCO, K.A.; COBBOLD, R.N.; RICE, D.H.; BESSER, T.E.; HANCOCK, D.D. Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Veterinary Microbiology*, v.98, p. 55–61, 2004.

DEHAUMONT, P. OIE International Standards on Antimicrobial Resistance. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, n. 51, p. 411–414, 2004.

DESCHEEMAER, P.R.M.; CHAPPELLE, S., DEVRIESE, L.A.; BUTAYE, P.; VANDAMME, P.; GOOSSENS, H. Comparison of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates and glycopeptide resistance genes of human and animal origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n.43, p.2032-2037, 1999.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. *Veterinary Microbiology*, v.56, p.99-109, 1997.

DONNELLY, J.P.; VOSS, A.; WITTE, W.; MURRAY, B.E. Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n.37, p.389-390, 1996.

EDELMAN, R.; KARMALI, M.A.; FLEMING, P.A. Summary of the International Symposium and Workshop of Infections due to vero-cytotoxin (Shiga-like toxin) - producing *Escherichia coli*. *Journal Infective Disease*, v.157, p.1102-1104, 1988.

EDLUND, Y.; MOLLSTEDT, B. O.; OUCHTERLONY, O. Bacteriological investigation of the biliary system and liver in biliary tract disease correlated to clinical data and microstructure of the gallbladder and liver. *Ada Chirurgica Scandinavica*, v. 116, p.461-76, 1959.

ERLINGER, S. *Bile flow in: the liver: biology and pathobiology*. New York, Raven Press Ltd, p.769-786, 1994.

ERTAS, H.B.; ÖZBEY, A.; KILIÇ, A.; MUZ, A. Isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from the gall bladder samples of sheep and identification by Polymerase chain Reaction. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.50, n.6, p. 294-297, 2003.

FERNANDEZ MURGA, M.L.; BERNICK, D.; DE VALDEZ, G.F.; DISALVO, A.E. Permeability and stability properties of membranes formed by lipids extracted from *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperatures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 364, p.115–121, 1999.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, n. 10, p. 226-236, 1929. (reimpressão *Review of Infectious Diseases*, v. 2, p. 129-139, 1980).

FLEMMING, R. J.; FLINT, L. M.; OSTERHOUT, S.; SHINGLETON, W. W. Bacteriological studies of biliary tract infection. *Annals of Surgery*, v. 166, p.563-72, 1967.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE - FSIS. Progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products, 1998-2002. Disponível em: <www.fsis.usda.gov/OPHS/haccp/salm5year.htm>. Acesso em: 23 jul. 2007.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRALICK J.A. Evidence that *ToiC* is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v.178, p. 5803–5805, 1996.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.182 p.

FRANCO, R.M. *Escherichia coli: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana*. Niterói, 2002. 144f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

FRANCO, R.M.; MANTILLA, S.P.S. *Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade antimicrobiana ao sorovares predominantes. *XIV Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia*, 08 – 12.11.2004. CD.

FRANCO, R.M.; LEITE, A.M.O. Enumeração e identificação de *Enterococcus* spp. e estirpes de *E. coli* patogênicas em carcaças de frango e estudo da atividade antimicrobiana das estirpes isoladas. In: *XV Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia*, 2005, Niterói. Anais... Niterói-RJ, 2005, CD.

FRANKEL, M. The biological splitting of conjugated bile acids. *Biochemical Journal*, v. 30, n. 2111, 1936.

GÄNZLE, M.G.; HERTEL, C.;VAN DER VOSSEN, J.M.B.M.; HAMMES, W.P. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and listeria in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology*, v. 48, p. 21–35, 1999.

GARCIA-LECHUZ JM, IGLESIAS L, VALLEJO M, GARCIA-ESCRIBANO N, GOMEZ-RODRIGUEZ JA, GARCIA-ARIAS V, ALCALA L, PELAEZ T, BOUZA E. *S. aureus* Isolation from gallbladder sites: an uncommon source of true infections. *Agents Chemotherapy*, n.43, p.14-17, 2003.

GARTNER, L.P.; HIALT, J.L. *Atlas colorido de Histologia*. 3º ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.436 p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 655p.

GRISI, S.J.F.E; EJZENBERG, B.; NETO, A.R.; KIMURA,H.; NETO, L.B.; HORITA, S.; BALDACCI, E.V. Bacteremia por *Salmonella* Typhimurium e acometimento pulmonar. *Pediatria (S. Paulo)*, v.5, p.313-316, 1983.

GRANJA, RODRIGO. *Drogas veterinárias e antibióticos: um panorama geral em carnes*. In: 5º SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 2004. *On line*...Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=527>. Acesso em: 30 de novembro de 2007.

GUNN, J.S. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, v.2, p. 907-913, 2000.

GÜRTLER, H.; KETZ, H.A.; KOLB, E.; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. *Fisiología veterinaria*. 2.ed. Espanha: Editorial Acribia, 1979.

GUYTON, A.C. *Tratado de fisiologia médica*. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. 926p.

HAGEMAN, J.C.; PEGUES, D.A.; JEPSON, C.; BELL, R.L.; GUINAN, M.; WARD, K.W.; COHEN, M.D.; HINDLER, J.A.; TENOVER, F.C.; MCALLISTER, S.K.; KELLUM, M.E.; FRIDKIN, S.K. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in a Home Health-Care Patient. *Emerging Infectious Diseases*, v.7, n.6, p. 1023-25, 2001.

HANCKE, E.; NUSCHE, A.; MARKLEIN, G. Bacteria in the Gallbladder wall and in gallstones. *Langenbecks Arch Chir*, v. 368, p. 249-254, 1986.

HARPER, H.A.; RODWELL,V.W.; MAYES, P.A. *Manual de química fisiológica*. 5.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1982. 736 p.

HAYES, P.R. *Microbiología y Higiene de los Alimentos*. Editorial Acribia: Espanha. 1993, 369 p.

HEROLD, B.C., KIRKPATRICK, R., MARCELLINO, D., TRAVELSTEAD, A., PILIPENKO, V., KRASA, H., BREMER, J., DONG, L.J. AND COOPER, M.D. Bile salts. Natural detergents for the prevention of sexually transmitted diseases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p. 745–751, 1999.

HEUMAN, D.M., BAJAJ, R.S. AND LIN, Q. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *Journal of Lipid Research*, v. 37, p. 562–573, 1996.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999. 446 p.

HOFMANN, A.F. Bile acids in: the liver: biology and pathobiology. New York, *Raven Press Ltd*, p. 677-718, 1994.

HOFMANN, A.F. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiology Science*, v. 14, p. 24–29, 1999.

HOLT, J. G. KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's: Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787 p. v.2.

HOLZMAN, D. Despite insights, antibiotic resistance raises serious concerns. *ASM News*, n.64, p.317-319, 1998.

HUNG, D.T.; JUN ZHU, D. S.; MEKALANOS, J.J. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, v. 59, p. 193-201, 2006

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JEONG, K.C.; KANG, M.Y.; HEINKE, C.; SHERE, J.A.; EROL, I.; KASPAR, C.W. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. *Veterinary Microbiology*, p. 1-7, 2006.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. 6 ed. São Paulo: Manole Ltda. 2000. 1415p.

KAMPELMACHER, E.H. The role of salmonellae in foodborne diseases. In: *Microbiological Quality of foods*. Ed. L.W. Slanetz et al., New York: Academic Press, p. 84-10, 1963.

Kawecki, D.; Chmura, A.; Pacholczyk, M.; Lagiewska, B.; Adadyński, L.; Wasiaś, D.; Malkowski, P.; Sawicka-Grzelak, A.; Rokosz, A.; Szymanowska, A.; Swoboda-Kopec, E.; Wroblewska, M.; Rowinski, W.; Durlik, M.; Paczek, L.; Luczak, M. Bacteria Isolated from bile samples of liver recipients in the early period after transplantation: epidemiology and susceptibility of the bacterial strains. *Transplantation Proceedings*, v.39, p. 2807–2811, 2007.

KONEMAN, E.W. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5 ed. Philadelphia: J.B.Lippincott, 1997.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 4 ed. Washington: American Public Health Association – APHA, 2001.676 p. Cap. 8.

KOSOWSKI, K.; KARCZEWSKA, E.; NOWAK, K.; UKASIEWICZ, J.; HECZKO, P.B.; POPIELA, T.; PANEK, M. Adherence of bile-isolated bacteria to the bile ducts mucosa as a pathogenic factor in the development of inflammatory lesions. *Medical Science Monitor*, 2000; v. 6, n. 2, p. 291-299, 2000.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams; Wilkins, 8th, Baltimore M.D. 1984, 964 p. v.1.

LE MINOR, L. Genus *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J. G. *Bergey's: Manual of Sistematic Bacteriology*. Williams; Wilkins, 8th, Baltimore M.D. 1984. 964 p. v.1.

LEGRAND-DEFRETIN, V.; JUSTE, C.; HENRY, R.; CORRING, T. Ion-pair high-performance liquid chromatography of bile salt conjugates: application to pig bile. *Lipids*, v. 26, p. 578–583, 1991.

LEVY, S.B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n.36, p. 695-703, 1992.

LIAU, D. F.; HASH, J.H. Structural analysis of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* M. *Journal of Bacteriology*, v.131, p.194-200, 1977.

LIMA, E. S. C.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; ALMEIDA, L. P.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 4, 2004.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, p.3-10, 2000a.

LIVERMORE, D.M. Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Medicine*, v.26, Suppl. 1:14-21, 2000b.

MA, D.; COOK, D.N.; HEARST, J.E.; NIKAIIDO, H., Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiology*, v.2, p. 489–493, 1994.

McDONOUGH, P. L.; SHIN, S. J.; LEIN, D. H. Diagnostic and public health dilemma of lactose-fermenting *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in cattle in the Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.1221-1226, 2000.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.N., PARKER, J. *Microbiologia de Brock*, 10. ed. São Paulo: Pearson-Prentice Hall, 2004.

MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; FRANCE, S.A.; KERN, W.V.; PAGÈS, J.M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 1223-1229, 2007.

MAIER T.W., ZUBRZYCKI L., COYLE M.B., CHILA M., WARNER P. Genetic analysis of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: production of increased resistance by the combination of two antibiotic resistance loci. *Journal of Bacteriology*, n.124, p. 834–842, 1975.

MANUAL MERCK DE INFORMAÇÃO MÉDICA. Seção 10 - Distúrbios do Fígado e da Vesícula Biliar- Biologia do Fígado e da Vesícula Biliar. 2004. Disponível em:<http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec10_114.htm>. Acesso em: 30 nov.2007.

MARTINI, F.C.C. *Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos*. Piracicaba, 2002. 113f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MASON, G. R. Bacteriology and antibiotic selection in biliary tract surgery. *Archives of Surgery*, v.97, p.533-7, 1968.

MELLEMGAAARD, A.; GAARSLEV, K. Risk of hepatobiliary cancer in carriers of *Salmonella Typhi*. *Journal National Cancer Institute*, v. 80, p.288, 1988.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 4 ed. Washington:American Public Health Association – APHA, 2001.676 p. Cap. 35.

MERCHANT, S.S; FALSEY, A.R. *Staphylococcus aureus* cholecystitis: a report of three cases with review of the literature. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v.75, n.5-6, p. 285-91, 2002.

MERCK *Microbiology Manual*. Berlin. Germany, 2000. 407p.

MICHELIN, A. F. Interação das enterotoxinas estafilocócicas com o sistema imune do hospedeiro. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, n. 24, p.83-95, 2003.

NIKAIDO, H.; BASINA, M.; NGUYEN,V.Y.; ROSENBERG, E.Y. Multidrug efflux pump acrab of *Salmonella typhimurium* excretes only those b-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n.17, p. 4686–4692, 1998.

NOH, D.O.; GILLILAND, S.E. Influence of bile on cellular integrity and b-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p.1253–1259, 1993.

NOSKIN, G.A., TILL, M., PATTERSON, T.M., CLARKE, J.Y., WARREN, J.R. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia. *Journal of Infectious Diseases*, n. 164, p. 1212–1215, 1991.

OKUSU H., MA D., NIKAIDO H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*, n.178, p. 306–308, 1996.

OHTOMO,T.; YOSHIDA,K.; SAN CLEMENTE, C.L. Effect of bile acid derivatives on taurine biosynthesis and extracellular slime production in encapsulated *Staphylococcus aureus* S-7. *Infection and Immunity*, v.31, n.2, p. 798-807, 1981.

ONYEKABA, C.O.; NJOKU, H.O. Bacteria and helminth isolates from bile and faeces of zebu cattle slaughtered for human consumption in the Niger Delta areas of Nigeria. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, v.80, n.4, p. 421-4, 1986.

ORSKOV, F. Genus I. *Escherichia coli*. CASTELLANI AND CHALMERS 1919. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J. G. *Bergey's: Manual of Sistematic Bacteriology*. Williams; Wilkins, 8th, Baltimore M.D. 1984. 964 p. v.1.

OSIER, W. *Modern Medicine*. Philadelphia, Lea Brothers, 1907.

PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*, Georgia, v.55, n. 7, p. 555-556, 1992.

PAELKE, A.; LENK, V.; SCHNEIDER, V. Initial results of bacterial contamination of the gallbladder in forensic medicine examination. *Beitr Gerichtl Medizin*, n. 47, p.497-502, 1989.

PAMVET. *Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo*. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 18 de outubro de 2007.

PANDEY, M; VISHWAKARMA, R. A; KHATRI AK, R.S.K.; SHUKLA, V.K. Bile, bacteria and carcinogenesis, *Journal of Surgical Oncologia* , v.58, p. 282–283, 1995.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. Goiânia, v 1, 2001, 623p.

PELCZAR JR, CHAN, KRIEG, EDWARDS, PELCZAR. *Microbiologia - Conceitos e Aplicações*, Volumes I e II, 2. Ed. São Paulo: Makron Books do Brasil Editora Ltda., 1997.

PETAKOVIC, G.; KORICA, M.; GAVRILOVIC, S. Bacteriologic examination of gallbladder contents. *Medicinski Pregled*, v.55, n.5-6, p.225-8, 2002.

PICKEN, R.N.; BEACHAM, I.R. Bacteriophage-resistant mutants of *Escherichia coli* K12. Location of receptors within the lipopolysaccharide. *Journal of General Microbiology*, v.102, p.305–318, 1977.

PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELE, M.C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.; GIAMMANCO, G. Evaluation of New Culture Media for Rapid Detection and Isolation of Salmonellae in Foods. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 61, n.5, p. 1996–1999, 1995.

PINTO, P.S.A. Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose. *Revista Higiene Alimentar*, v.14, n.73, p.39-43, 2000.

POPE, L.M., REED, K.E. AND PAYNE, S.M. Increased protein secretion and adherence to HeLa cells by *Shigella* spp. following growth in the presence of bile salts. *Infection and Immunity*, n. 63, 3642–3648, 1995.

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canadá. *International Journal Food Microbiology*, v. 21, p. 1- 5, 1994.

POWELL, A.A., LARUE, J.M.; MARTINEZ, J.D. Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in hct116 cells. *Biochemical Journal*, v. 356, p. 481–486, 2001.

PRIDMORE, R.D.; BERGER, B.; DESIERE, F.; VILANOVA, D.; BARRETTO, C.; PITTET, A.C.; ZWAHLEN, M.-C.; ROUVET, M.; ALTERMANN, E.; BARRANGOU, R.; MOLLET, B.; MERCENIER, A.; KLAENHAMMER, T.; ARIGONI, F.; SCHELL, M.A. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC533. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 2512–2517, 2004.

PROCÓPIO FILHO, A. O contrabando de produtos da bovinocultura no Mercosul. *Meridiano 47 boletim de análise de conjuntura em relações internacionais* ISSN 1518-1219. 01 de junho de 2007. Disponível em :<<http://meridiano47.info/2007/06/01/o-contrabando-de-produtos-da-bovinocultura-no-mercosul/>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2007.

PROUTY, A.M., SCHWESINGER, W.H.; GUNN, J.S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, v.70, p. 2640–2649, 2002.

PROUTY, A. M.; VAN VELKINBURGH, J. C.; GUNN J. S. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the tolQRA cluster. *Journal of Bacteriology*, v.184, p.1270–1276, 2002a.

PROUTY, A.M.; BRODSKY, I.E.; MANOS, J.; BELAS, R.; FALKOW, S.; GUNN, J.S. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* genes by bile. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 41, p.177–185, 2004.

RAJI, M.A.; ADEKEYE, J.O.; KWAGA, J.K.P.; BALE, J.O.O. Bioserogroups of *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna States Nigeria. *Small Ruminants Research*, v. 37, p. 215-221, 2000.

RAMOS-MORALES, F.; PRIETO, A.I.; BEUZÓN, C.R.; HOLDEN, D.W.; CASADÉSUS, J. Role for *Salmonella enterica* Enterobacterial Common Antigen in Bile Resistance and Virulence. *Journal of Bacteriology*, v.185, n.17, p. 5328-5332, 2003.

RICHMOND, M.H. Some environmental consequences of the use antibiotics: or what goes up must come down. *Journal of Applied Bacteriology*, v.35, p. 155-176, 1972.

RODRIGUES, D.P. *Ecologia e prevalência de Salmonella spp. em aves e material avícola no Brasil*. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. *Anais...*Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas, 2005, v.2, p. 223-237.

RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, v. 44, p. 464-475, 2002.

SAKURAI, S.; SHINAGAWA, N.; FUKUI, T.; YURA, J. Bacterial adherence to human gallbladder epithelium. *Surgery Today*, v. 22, n.6, p.504-507, 1992

SALMINEN, S., ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.70, p. 347–358, 1996.

SANCHEZ, L., PAN W., VINAS M., NIKAIDO H. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *Journal of Bacteriology*, n.179, p. 6855–6857, 1997.

SANTOS, B.M.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, V.V. *Principais doenças bacterianas das aves*. 2 ed. Viçosa: UFV, 2005. Caderno didático, 47p.

SCHABERG, D.R., CULVER, D.H., GAYNES, R.P. Major trends in microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine*, supplement 3B, p. 725– 758, 1991.

SHERIDAN, J. J. Sources of contamination during slaughter and measures for control. *Journal of Food Safety*, Trumbull, v. 18, n. 4, p. 321-339, 1998.

SHIMAKAWA, Y.; MATSUBARA, S.; YUKI, N.; IKEDA, M.; ISHIKAWA, F. Evaluation of bifidobacterium breve yakult-fermented soymilk as a probiotic, *Food Institute and Journal of Food Microbiology*, v. 81, p.131–136, 2003.

SHUKLA, V. K.; SINGH, H.; PANDEY, M.; UPADHYAY, S. K.; NATH, G. Carcinoma of the Gallbladder—Is It a Sequel of Typhoid? *Digestive Diseases and Sciences*, v. 45, n. 5, 2000.

SILVA, E. N. *Medidas gerais de controle de salmonelas em frangos*. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. *Anais...*Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas, 2005, 2v. V.2, p. 229-237.

SILVA, N. *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. Campinas, 2004. 106f. Tese (doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SINDAN. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL. *Mercado veterinário por classes terapêuticas e mercado veterinário por espécie animal*. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em 20 de outubro de 2007.

SMITH, J.W.G. Memorandum of evidence to the agricultural committee inquiry on *Salmonella* in eggs. *Public Health Laboratory Service Microbiology Digest*, v. 6, p. 1-9, 1989.

SORAINO, F.; PONTE, M. C. Comparative activities of aztreonam and cefotaxime against *Escherichia coli* and *Bacteroides* spp. in pure and mixed cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.26, p. 39-41, 1984.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002. 752 p.

STINSON, W.; CALHOUN, L.M. *Histologia veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982.656 p.

STOFFREGEN, W.C.; NYSTROM, E.A.D. Targeting *E.coli* infections at their source. *Agricultural Research Magazine*, v.52, n.8, p.14-15, aug. 2004.

STOFFREGEN, W.C.; POHLENZ, J.F.L.; NYSTROM, E.A.D. *Escherichia coli* O157:H7 in the gallbladders of experimentally infected calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.16, n.1, p.79-83, jan. 2004.

TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of Public Laboratory in the problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.38, n.2, p.119-127, 1996.

TAVARES, W.T. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.3, 2000.

THANASSI, D.G.; CHENG, L.W.; NIKAIDO, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, p. 179, v.2512–2518, 1997.

THURUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 2 ed. London: Editora Blackwell Publishing, 2003. 483 p.

TORTORA, G.J.; FUNKE, R. B; CASE, C.L. *Introducción a la microbiología*. Editorial Acribia: Espanha. 1993. 792 p.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. *Microbiologia*. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 398p.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Part IV: Antimicrobial use of U.S. Dairy Operations, 2002*. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/dairy02/Dairy02-Pt04_AntibioticUse.pdf>. Acesso em 20 de outubro de 2007.

VAN DEN BOGAARD, A.E., STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.14, p. 327–335, 2000.

VAN VELKINBURGH, J.C.; GUNN, J.S. *PhoP–phoQ* regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity* v. 67, p.1614–1622, 1999.

VARALDO, O. E.; CIPRIANI, P.; FOCA, A.; GERACI, A.;GIORDANO, A.; MADEDDU, M.A.; ORSI, A.; POMPEI, R.; PRENNA, M.;REPETTO, A.; RIPA, S.; ROSSELLI, P.;RUSSO, G.;SCAZZOCCHIO, F.; STASSI, G.I dentification, Clinical Distribution, and Susceptibility to Methicillin and 18 Additional Antibiotics of Clinical Staphylococcus Isolates: Nationwide Investigation in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, n.6, p. 838-843, 1984.

VARNAN, A.H.; EVANS, M.G. *Foodborne pathogens*. Manson Publishing, 1996. 557p.

WAAR, K., VAN DER MEI, H.C., HARMSSEN, J.M., DEGENER, J.E.; BUSSCHER, H.J. Adhesion to bile drain materials and physicochemical surface properties of enterococcus faecalis strains grown in the presence of bile. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p. 3855–3858, 2002.

WATSON, J. F. The role of bacterial infection in acute cholecystitis: a prospective clinical study. *Military Medicine*, v.134, p. 416-26, 1969.

WELLS, S.J.; FEDORKA-CRAY, O.J.; DARGARTZ, D.A.; FERRIS, K.; GREEN, A. Faecal shedding of *Salmonella* spp. by dairy cows on farms and at cull cow markets. *Journal of Food Protection*, n. 64, p.3-11, 2001.

ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.F.; WHITE, D.G.; QAIYUMI, S.; FRIEDMAN, S.L.; ABBOTT, J.W.; GLENN, A.; AYERS, S.L.; POST, K.W.; FALES, W.H.; WILSON, R.B.; REGGIARDO, C.; WALKER, R.D. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Veterinary Microbiology*, v. 123 p. 122–132, 2007.

ZAVADINACK NETO, M.; HERREIRO, F.; BANDEIRA C. O. P.; ITO, Y.; CIORLIN E.; SAQUETI, E. E.; ANSILIEI, J. E.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V. L. D. *Staphylococcus aureus*: Incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. *Acta Scientiarium*, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.

8 APÊNDICE

8.1 PERFIL BACTERIOLÓGICO DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Quadro 1. Presença de *Samonella* spp. por amostras de vesículas biliares.

Amostras	<i>Samonella</i> spp.	
	Líquido biliar	Epitélio vesical
	Resultado	Resultado
1	-	-
2	+	-
3	+	-
4	+	+
5	+	+
6	-	+
7	-	+
8	+	+
9	-	+
10	+	+
11	+	-
12	-	-
13	+	+
14	-	-
15	+	-
16	+	+
17	+	+
18	-	-
19	-	+
20	-	+
21	+	-
22	-	+
23	-	-
24	-	-
25	+	+
26	-	-
27	+	+
28	+	+
29	-	+
30	+	+

+ = Estirpes positivas às provas; - =Estirpes negativas às provas.

Quadro 2. Contagem de Bactéria Heterotrófica Aeróbia Mesófila por amostras de vesículas biliares.

Amostras	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM)	
	Líquido biliar	Epitélio Vesical
	UFC/mL	UFC/g
1	0	0
2	0	$7,0 \times 10^6$
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	$6,8 \times 10^5$
7	0	$6,6 \times 10^6$
8	0	$1,3 \times 10^5$
9	3×10^2	0
10	0	$2,0 \times 10^4$
11	0	$3,0 \times 10^5$
12	0	$6,7 \times 10^5$
13	0	$4,0 \times 10^4$
14	0	0
15	0	$3,0 \times 10^4$
16	$2,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^7$
17	$8,9 \times 10^3$	$2,1 \times 10^6$
18	$4,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^7$
19	$1,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
20	$1,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$
21	0	$2,5 \times 10^7$
22	0	$2,3 \times 10^6$
23	1×10^2	$3,0 \times 10^4$
24	0	$2,0 \times 10^4$
25	0	$3,7 \times 10^5$
26	1×10^2	$6,0 \times 10^4$
27	0	$2,5 \times 10^6$
28	0	$5,2 \times 10^5$
29	0	$3,7 \times 10^5$
30	0	$4,9 \times 10^5$
Média	$1,8 \times 10^3$	$2,9 \times 10^6$
Média em Base Log	3,25	6,46

0 = Não houve crescimento.

Quadro 3. Enumeração de *E. coli* por amostras de vesículas biliares.

Amostras	Enumeração de <i>E. coli</i>	
	Líquido biliar	Epitélio Vesical
	UFC/mL	UFC/g
1	0	0
2	$3,6 \times 10^1$	$3,0 \times 10^4$
3	$3,6 \times 10^2$	0
4	0	$9,2 \times 10^3$
5	0	$7,4 \times 10^3$
6	0	$9,3 \times 10^4$
7	0	$9,3 \times 10^4$
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	$2,1 \times 10^4$
12	0	$2,7 \times 10^4$
13	0	0
14	0	0
15	$4,6 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$
16	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^4$
17	0	$2,3 \times 10^4$
18	$2,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$
19	$4,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$
20	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
21	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
22	$2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$
23	0	0
24	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^3$
25	0	0
26	$1,1 \times 10^2$	$3,6 \times 10^3$
27	$3,6 \times 10^1$	$1,1 \times 10^6$
28	0	$3,6 \times 10^3$
29	0	$3,6 \times 10^1$
30	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^3$
Média	$1,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$
Média em Base Log	3,07	5,37

0 = Ausência do microrganismo.

Quadro 4. Contagem e identificação bioquímica de Enterobactérias presentes por amostras de líquido biliar.

Amostras	Família <i>Enterobacteriaceae</i>				
	Líquido biliar				
	UFC/mL	O/F	Oxidase	Redução do nitrato	Resultado UFC/mL
1	0	xx	xx	xx	0
2	0	xx	xx	xx	0
3	0	xx	xx	xx	0
4	0	xx	xx	xx	0
5	0	xx	xx	xx	0
6	0	xx	xx	xx	0
7	0	xx	xx	xx	0
8	0	xx	xx	xx	0
9	0	xx	xx	xx	0
10	0	xx	xx	xx	0
11	0	xx	xx	xx	0
12	0	xx	xx	xx	0
13	0	xx	xx	xx	0
14	0	xx	xx	xx	0
15	1X10 ²	+	-	+	1X10 ²
16	0	xx	xx	xx	0
17	0	xx	xx	xx	0
18	0	xx	xx	xx	0
19	0	xx	xx	xx	0
20	0	xx	xx	xx	0
21	0	xx	xx	xx	0
22	1,4X10 ⁵	+	-	+	1,4X10 ⁵
23	0	xx	xx	xx	0
24	0	xx	xx	xx	0
25	0	xx	xx	xx	0
26	4,0X10 ²	+	-	+	4,0X10 ²
27	7,0X10 ²	+	-	+	7,0X10 ²
28	1,0X10 ²	+	-	+	1,0X10 ²
29	0	xx	xx	xx	0
30	0	xx	xx	xx	0
Média	xx	xx	xx	xx	4,7x10 ³
Média em Base Log	xx	xx	xx	xx	3,67

+ = Estirpes positivas às provas; - =Estirpes negativas às provas.

xx = Teste não realizado

0 = Não houve crescimento.

Quadro 5. Contagem e identificação bioquímica de Enterobactérias presentes por amostras de epitélio vesical.

Amostras	Família <i>Enterobacteriaceae</i>				
	Epitélio vesical				
	UFC/g	O/F	Oxidase	Redução do nitrato	Resultado UFC/g
1	0	xx	xx	xx	0
2	1,0X10 ⁵	+	-	+	1,0X10 ⁵
3	0	xx	xx	xx	0
4	1,5X10 ⁴	+	-	+	1,5X10 ⁴
5	4,5X10 ⁴	+	-	+	4,5X10 ⁴
6	6,8X10 ⁵	-	-	-	0
7	3,6X10 ⁴	+	-	+	3,6X10 ⁴
8	0	xx	xx	xx	0
9	0	xx	xxx	xxx	0
10	0	xx	xx	xx	0
11	3,0X10 ⁵	+	-	+	3,0X10 ⁵
12	2,4X10 ⁶	+	-	+	2,4X10 ⁶
13	0	xx	xx	xx	0
14	0	xx	xx	xx	0
15	0	xx	xx	xx	0
16	2,1x10 ⁵	+	-	-	0
17	0	xx	xx	xx	0
18	1,0X10 ⁵	+	-	+	1,0X10 ⁵
19	7X10 ⁴	+	-	+	7X10 ⁴
20	0	xx	xx	xx	0
21	2,3X10 ⁶	+	-	+	2,3X10 ⁶
22	2,5X10 ⁷	+	-	+	2,5X10 ⁷
23	0	xx	xx	xx	0
24	0	xx	xx	xx	0
25	0	xx	xx	xx	0
26	2,7x10 ⁵	+	-	-	0
27	1,1X10 ⁶	+	-	+	1,1X10 ⁶
28	1,0X10 ⁴	+	-	+	1,0X10 ⁴
29	0	xx	xx	xx	0
30	0	xx	xx	xx	0
Média	xx	xx	xx	xx	1,0X10 ⁶
Média em Base Log	xx	xx	xx	xx	6,02

+ = Estirpes positivas às provas; - =Estirpes negativas às provas.

xx = Teste não realizado

0 =Não houve crescimento.

Quadro 6. Identificação do gênero *Staphylococcus* por amostras de líquido biliar.

Amostras	Líquido biliar							Resultado
	UFC/mL	Gram*	Coagulase	Catalase	O/F glicose e manitol	DNase	TDA Dnase	
1	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
2	1,5x10 ⁵	CGP	++++	+	+	+	+	<i>S.aureus</i> coagulase positiva
3	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
4	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
5	1,0x10 ²	CGP	+++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
6	5,5x10 ²	CGP	-	-	-	-	-	xx
7	3,0x10 ²	BGP	xx	xx	xx	xx	xx	xx
8	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
9	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
10	1,5x10 ³	BGP	xx	xx	xx	xx	xx	xx
11	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
12	1,0x10 ³	BGP	xx	xx	xx	xx	xx	xx
13	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
14	1,1x10 ³	CGP	-	-	-	-	-	xx
15	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
16	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
17	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
18	5,0x10 ²	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
19	4,0x10 ²	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
20	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
21	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
22	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
23	6,0x10 ²	CGP	+++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
24	6,0x10 ²	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
25	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
26	3,0x10 ²	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
27	4x10 ²	BGP	xx	xx	xx	xx	xx	xx
28	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
29	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
30	4,3x10 ³	CGP	+++++	+	+	+	+	<i>S.aureus</i> coagulase positiva

*CGP= Cocos Gram Positivos; BGP=Bastonete Gram positivo.

+ = Estirpes positivas às provas; - =Estirpes negativas às provas.

xx = Teste não realizado

0 = Não houve crescimento.

Quadro 7. Identificação do gênero *Staphylococcus* por amostras de epitélio vesical.

Amostras	Epitélio vesical							
	UFC/mL	Gram*	Coagulase	Catalase	O/F glicose e manitol	DNase	TDA Dnase	Resultado
1	5,0x10 ⁶	CGP	+++	+	+	+	+	<i>S.aureus</i> coagulase positiva
2	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
3	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
4	2,0x10 ⁴	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
5	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
6	3,4x10 ⁵	CGP	-	-	-	-	-	xx
7	1,7x10 ⁴	CGP	-	-	-	-	-	xx
8	2,0x10 ⁶	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
9	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
10	2,1x10 ⁶	CGP	-	-	-	-	-	xx
11	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
12	8,9x10 ⁶	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
13	1,8x10 ⁶	BGP	xx	xx	xx	xx	xx	xx
14	3,6x10 ⁶	CGP	-	-	-	-	-	xx
15	6,0x10 ⁵	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
16	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
17	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
18	3,2x10 ⁵	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
19	3,6x10 ⁵	CGP	-	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> negativa
20	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
21	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
22	5,0x10 ⁴	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
23	3,6x10 ⁴	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
24	1,8x10 ⁵	CGP	+++++	+	+	+	+	<i>S.aureus</i> coagulase positiva
25	6,0x10 ⁴	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
26	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
27	1,6x10 ⁵	BCP	xx	xx	xx	xx	xx	xx
28	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
29	1,0x10 ⁴	CGP	++++	+	+	-	-	<i>S. coagulase</i> positiva
30	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx

*CGP= Cocos Gram Positivos; BGP=Bastonete Gram positivo.

+ = Estirpes positivas às provas; - =Estirpes negativas às provas; xx= Teste não realizado.

0 = Não houve crescimento.

Quadro 8. Dados gerais do isolamento do gênero *Staphylococcus* de 30 amostras de líquido biliar.

Dados do isolamento e identificação	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>S. aureus</i> coagulase positiva	Gênero <i>Staphylococcus</i>
Freqüência	1	5	2	8
Média	$4,0 \times 10^2$	7×10^1	$5,1 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$
Média Bae Log	2,60	1,84	3,71	3,72

Quadro 9. Dados gerais do isolamento do gênero *Staphylococcus* de 30 amostras de epitélio vesical.

Dados do isolamento e identificação	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>S. aureus</i> coagulase positiva	Gênero <i>Staphylococcus</i>
Freqüência	7	3	2	12
Média	$4,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
Média Bae Log	5,61	3,54	5,23	5,77

Quadro 10. Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Amicacina	Ampicilina	Cefalotina	Cefotaxima	Ceftadizima	Sulfazotrim
2	S	R	R	R	R	R
3	S	R	R	R	R	R
4	R	R	R	R	R	R
5	S	R	R	M/S	S	R
8	I	I	S	M/S	S	R
10	R	R	R	R	S	R
11	R	R	R	R	R	R
13	R	R	R	R	R	R
15	R	R	R	R	M/S	R
16	S	R	R	R	S	R
17	S	S	R	R	R	R
21	S	M/S	R	S	S	S
25	S	R	R	M/S	S	R
27	S	R	R	S	S	R
28	R	R	R	M/S	S	R
30	S	R	R	R	S	R

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 11. Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Aztreonam	Cefoxitina	Ceftriaxona	Cloranfenicol	Gentamicina	Tetraciclina
2	R	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R	R
4	R	R	R	R	R	R
5	S	R	R	S	R	R
8	R	R	R	R	R	R
10	M/S	S	S	S	S	I
11	S	R	M/S	S	I	S
13	M/S	R	M/S	R	R	R
15	M/S	M/S	M/S	R	R	R
16	M/S	R	M/S	S	S	R
17	M/S	M/S	S	S	S	S
21	S	R	S	S	R	I
25	S	R	S	R	S	I
27	M/S	S	M/S	S	R	R
28	M/S	S	M/S	S	R	R
30	M/S	R	R	R	S	R

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 12. Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Amicacina	Ampicilina	Cefalotina	Cefotaxima	Ceftadizima	Sulfazotrim
4	S	R	R	M/S	S	R
5	R	R	R	R	R	R
6	R	R	R	R	R	R
7	S	S	R	S	S	S
8	S	S	R	S	S	R
9	S	M/S	R	M/S	S	R
10	R	M/S	R	S	S	S
13	S	R	R	M/S	S	R
16	R	R	R	R	R	R
17	S	R	R	M/S	S	S
19	S	R	R	M/S	S	I
20	R	R	R	M/S	S	R
22	S	S	R	S	S	R
25	R	R	R	M/S	S	R
27	S	R	R	M/S	S	R
28	S	R	R	M/S	S	R
29	S	M/S	R	S	S	S
30	S	R	I	M/S	S	S

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 13. Estirpes de *Salmonella* spp. presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Aztreonam	Cefoxitina	Ceftriaxona	Cloranfenicol	Gentamicina	Tetraciclina
4	R	R	R	R	R	R
5	S	R	R	S	R	R
6	R	R	R	R	R	R
7	R	R	R	R	R	R
8	S	S	M/S	S	S	I
9	S	S	S	S	R	I
10	M/S	S	S	S	S	I
13	S	R	R	R	S	R
16	M/S	R	S	S	S	S
17	M/S	R	M/S	S	R	I
19	S	R	S	S	R	I
20	M/S	R	S	S	S	I
22	M/S	R	S	S	S	S
25	M/S	S	M/S	S	R	I
27	M/S	S	M/S	S	S	R
28	S	S	M/S	R	R	R
29	S	S	S	S	R	R
30	S	R	R	R	S	R

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 14. Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Clindamicina	Eritromicina	Oxacilina	Penicilina G	Teicoplamina	Vancomicina
2	S	R	S	R	R	S
5	I	R	S	R	R	S
18	I	R	S	R	S	S
19	S	S	S	R	S	R
23	I	R	S	R	R	R
24	S	R	S	R	I	R
26	I	R	S	R	S	S
30	S	R	S	R	S	R

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 15. Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no líquido biliar testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Aztreonam	Cefoxitina	Ceftriaxona	Cloranfenicol	Gentamicina	Tetraciclina
2	R	R	S	S	S	R
5	R	R	S	S	S	R
18	R	R	S	S	S	R
19	R	R	S	S	S	R
23	R	R	S	S	S	R
24	R	R	S	S	S	R
26	R	S	S	S	S	S
30	S	R	S	S	S	S

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 16. Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Clindamicina	Eritromicina	Oxacilina	Penicilina G	Teicoplamina	Vancomicina
1	R	S	S	R	S	S
4	S	S	S	R	S	S
8	S	S	S	R	S	S
12	S	S	S	R	S	S
15	S	R	S	R	S	S
18	S	R	S	R	S	S
19	S	R	S	R	S	S
22	S	S	S	R	S	S
23	S	S	S	R	S	S
24	R	S	R	R	S	S
25	S	S	S	R	S	S
29	S	S	S	R	S	S

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível.

Quadro 17. Estirpes do gênero *Staphylococcus* presentes no epitélio vesical testadas frente a antimicrobianos.

Estirpes	Aztreonam	Cefoxitina	Ceftriaxona	Cloranfenicol	Gentamicina	Tetraciclina
1	R	R	M/S	S	S	R
4	R	R	S	S	S	S
8	R	S	S	S	S	R
12	R	S	S	S	S	R
15	R	S	S	S	S	R
18	R	R	S	S	S	R
19	R	S	S	S	S	R
22	R	S	S	S	S	S
23	R	S	S	S	S	S
24	S	S	S	S	S	S
25	R	R	S	S	S	S
29	R	S	S	S	S	S

R=Resistente; I=Intermediário; M/S=Moderado/Sensível; S=Sensível

8.2 FOTOGRAFIAS

Figura 9. No frigorífico, a vesícula biliar ainda aderida ao fígado.



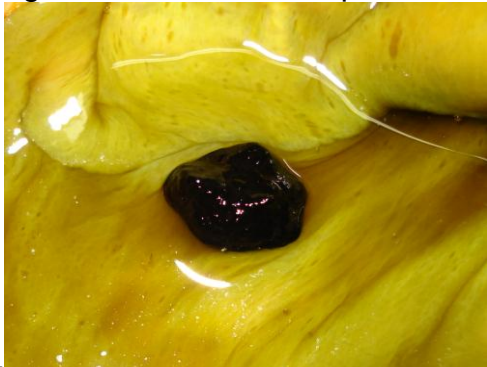
Figura 10. Epitélio vesical



Figuras 11 e 12. Epitélio da vesícula biliar sendo retirado para a pesquisa.



Figura 13. Cálculo biliar presente na vesícula de nº 30.



Figuras 14 e 15. Teste confirmativo de *E. coli*: fluorescência positiva e Kovac's positivo.

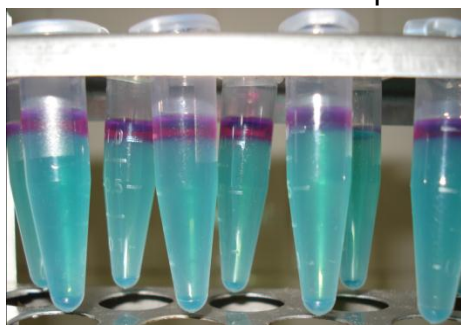
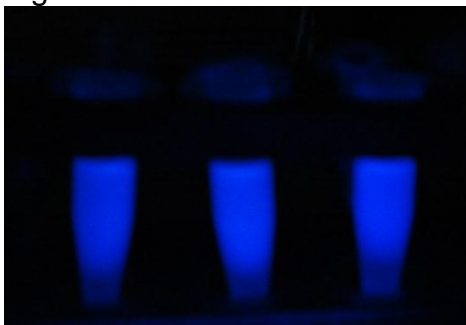
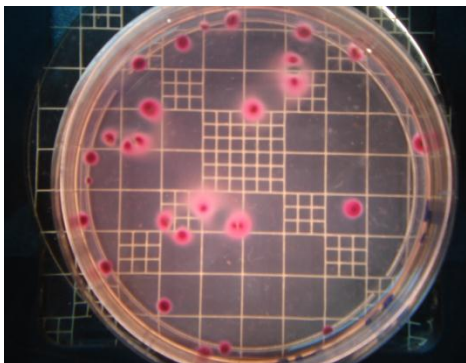


Figura 16. Ágar VRBG com crescimento sugestivo de bactérias da família *Enterobacteriaceae*.



Figuras 17 e 18. Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Bactérias Gram negativas.

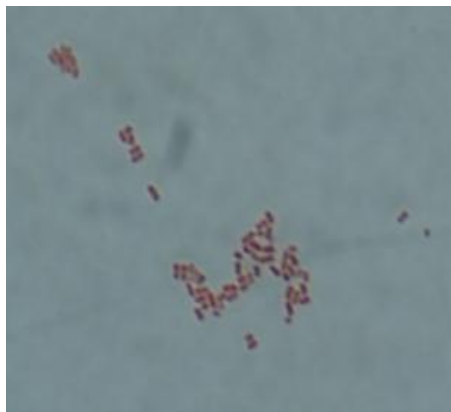
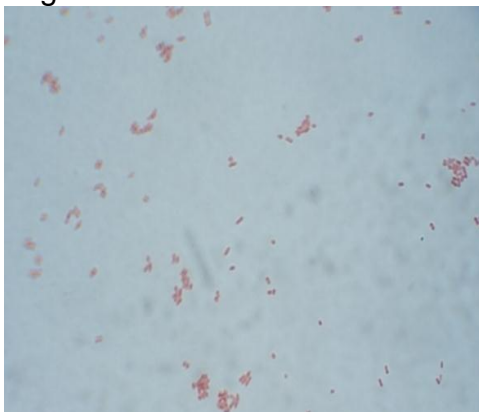


Figura 19. Teste de Oxidase negativo para identificação da família *Enterobacteriaceae*.



Figura 20. Teste de O/F da glicose negativo para identificação da família *Enterobacteriaceae*. Os dois tubos deveriam apresentar coloração amarela.

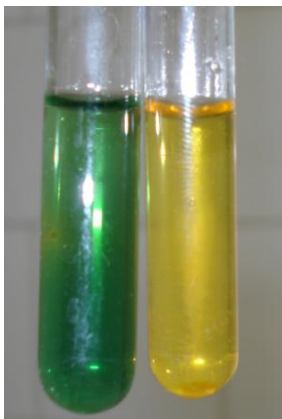
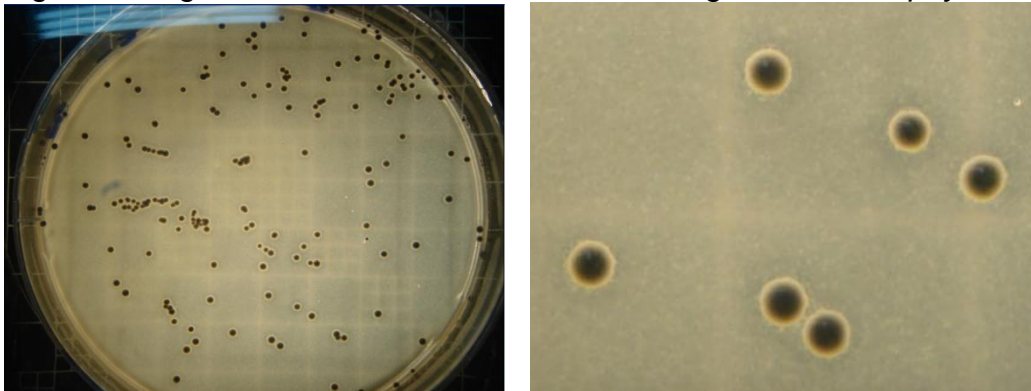


Figura 21. Teste de redução de nitrato para identificação da família *Enterobacteriaceae*. O tubo vermelho indica redução e no tubo incolor foi adicionado pó de zinco e como permaneceu incolor, caracteriza redução completa do nitrato.



Figura 22. Ágar Baird Parker com crescimento sugestivo de *Staphylococcus aureus*.



Figuras 23 e 24. Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Presença de cocos Gram positivos.

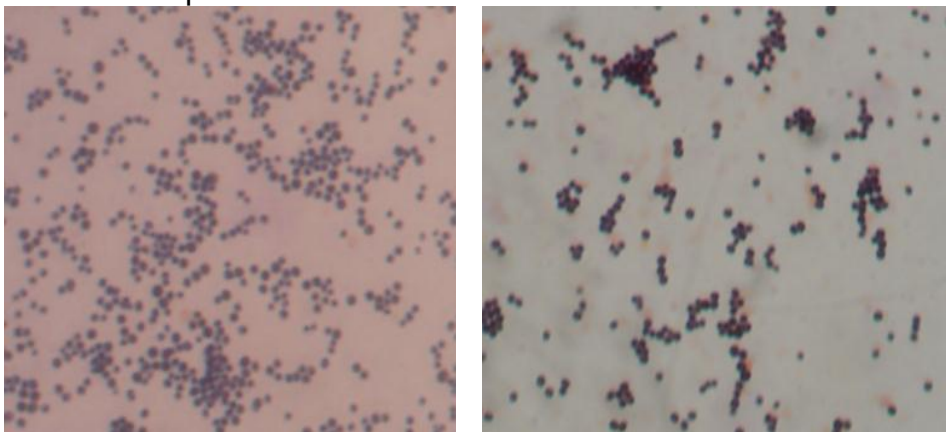


Figura 25. Teste da catalase. O tubo da direita é catalase positiva. Estirpes de *S.aureus* são catalase positivas.



Figura 26. Teste da coagulase. No fundo do “ependorf” ocorre a formação de coágulo. Estirpes de *S.aureus* são coagulase positivas.

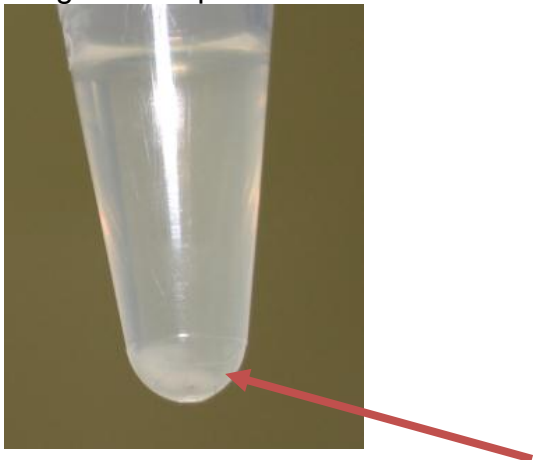


Figura 27. Teste O/F glicose e manitol. Resultado negativo, pois estirpes de *S. aureus* realizam oxidação e fermentação da glicose e manitol, devendo então ocorrer a viragem dos tubos para amarelo.

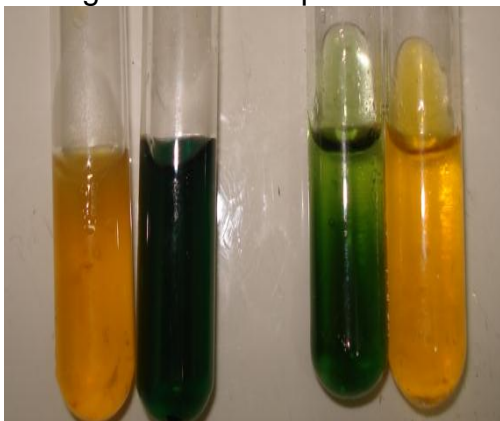


Figura 28. Teste de DNase. A presença de coloração rosa ao redor indica prova positiva. Estirpes de *S.aureus* são DNase positivas.

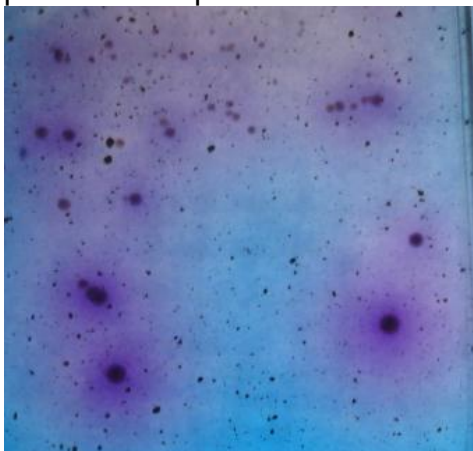


Figura 29. Ágar Rambach com crescimento de colônias sugestivas de *Salmonella* spp. (exceção colônias verdes).

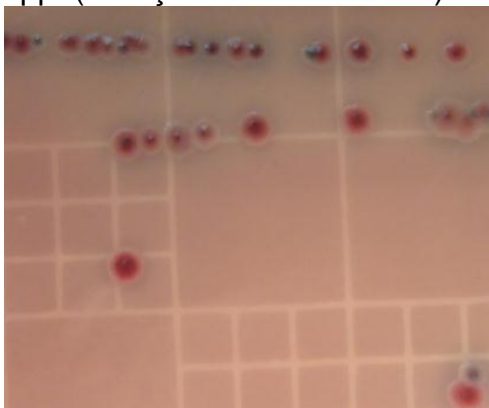


Figura 30. Foco em uma colônia no Ágar Rambach sugestiva de *Salmonella* spp.



Figura 31. Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. Presença de bastonetes Gram negativos.



Figura 32. Prova indicativa de *Salmonella* spp. no Ágar TSI.



Figura 33. Reação de aglutinação frente ao soro polivalente anti-*Salmonella*.



Figura 34 e 35. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Halo ao redor do antimicrobiano é indicativo de sensibilidade.

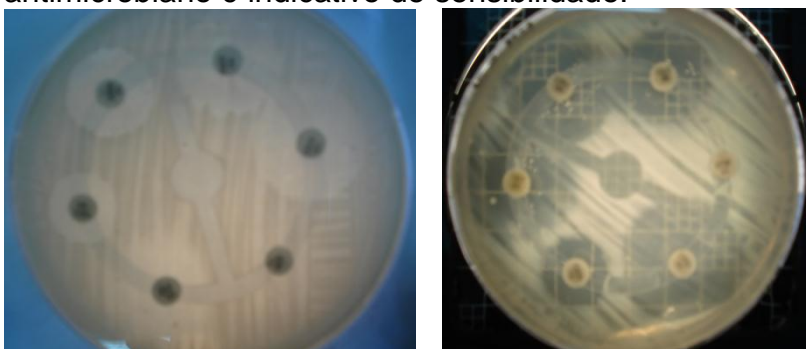


Figura 36. Estirpe resistente aos fármacos testados.

