

Júnia Pacheco Teixeira

**EFEITO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE SOBRE A COLONIZAÇÃO
DE *Escherichia coli* O157: H7 NA MUCOSA INTESTINAL DE
CAMUNDONGOS Balb/C.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Prof. Nivaldo da Silva

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2008

T266e Teixeira, Júnia Pacheco, 1975-
Efeito das proteínas do soro de leite sobre a colonização de *Escherichia coli* O157: h7 na mucosa intestinal de camundongos Balb/C. Júnia Pacheco Teixeira. – 2008.
48 p. : il.

Orientador: Nivaldo da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Soro do leite – Teses. 2. Sistema gastrointestinal – Doenças – Teses.
3. *Escherichia coli* – Teses. Infecção – Teses. I. Silva, Nivaldo da. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 616.34

Folha de assinaturas

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e por me dar coragem e perseverança para vencer este desafio.

Ao meu orientador, o professor Dr. Nivaldo da Silva, pela dedicação, respeito, amizade, honestidade e carinho. Obrigada por me ensinar a agir com sabedoria, a enfrentar novos desafios e aprender uma lição de vida a cada dia.

Ao professor Dr. Leorges Moraes da Fonseca, pela confiança em nosso trabalho.

Aos professores, Dr. Anilton César Vasconcelos, Dr. Jacques Robert Nicoli e Dr. Luiz Simeão do Carmo, pela gentileza, cooperação, amizade e respeito com que nos acolheram.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo incentivo.

À minha família, por todo carinho, dedicação e apoio.

Ao Jorge, pelo amor e compreensão.

À minha grande amiga, Érica Leandro Marciano Vieira, por me apoiar, incondicionalmente, nesta caminhada.

Ao Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal - DTIPOA, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - DMVP e à Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEP/MVZ.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 PROPRIEDADES DO SORO DO LEITE	10
2.2 TOXINFECÇÕES ALIMENTARES CAUSADAS POR <i>E. COLI</i> O157: H7	11
2.3 CARACTERÍSTICAS DA <i>E. COLI</i> O157: H7	12
.3.1 <i>Morfologia e Bioquímica</i>	12
2.3.2 <i>Termotolerância, acidez e enterotoxinas</i>	13
2.3.3 <i>Fatores de virulência</i>	14
2.3.4 <i>Morte celular programada</i>	16
2.3.5 <i>Patogenicidade</i>	16
2.4 CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA CAUSADA POR <i>E. COLI</i> O157: H7	17
2.4.1 <i>Faixa etária da doença</i>	17
2.4.2 <i>Período de incubação</i>	17
2.4.3 <i>Tratamento</i>	18
2.5 FUNÇÕES IMUNOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DO SORO.....	18
2.5.1 <i>Alfa-lactalbumina (α-Lg) e beta-lactoglobulina (β-Lg)</i>	18
2.5.2 <i>Concentrado protéico de soro “WPC”</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	20
3.2 AMOSTRA DE BACTÉRIA UTILIZADA.....	20
3.3 CULTIVO DA AMOSTRA DE <i>E. COLI</i> O157: H7.....	20
3.4 ANIMAL EXPERIMENTAL	20
3.5 TRIAGEM E INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	20
3.6 FONTES PROTÉICAS: ALFA-LACTALBUMINA, BETA-LACTOGLOBULINA E CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO - “WPC”	21
3.7 SEPARAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	21
3.8 ENUMERAÇÃO E DETECÇÃO DA <i>E. COLI</i> O157: H7	22
3.9 CONTAGEM BACTERIANA EM AMOSTRAS DE FEZES.....	22
3.10 PROVA DO LÁTEX.....	22
3.11 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	22
3.12 SEGMENTOS INTESTINAIS E HISTOPATOLOGIA.....	22
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 CONSUMO DE DIETAS.....	23
4.2 GANHO DE PESO	25
4.3 CONTAGEM DE UFC E ENUMERAÇÃO DE <i>E. COLI</i> O157: H7	26
4.4 PROVA DO LÁTEX	30
4.5 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E FISIOLÓGICAS	31
4.6 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS.....	31
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sinais de transdução do hospedeiro afetado pela infecção por <i>E. coli</i>	15
Figura 2 – Consumo das diferentes dietas, durante sete dias, entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria.....	24
Figura 3 – Consumo das diferentes dietas, durante sete dias, entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria.....	24
Figura 4 – Consumo das diferentes dietas, durante sete dias, entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria.....	25
Figura 5 – Altura das vilosidades intestinais dos jejunos distais, pela morfometria, após os sete dias experimentais, avaliados nos grupos desafiados com a bactéria.....	32
Figura 6 – Altura das vilosidades intestinais dos íleos, pela morfometria, após os sete dias, avaliados entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria.....	33
Figura 7 – Altura das vilosidades intestinais dos íleos, pela morfometria, após os sete dias, avaliados nos grupos desafiados com a bactéria.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de aminoácidos essenciais no concentrado protéico de soro “WPC” em relação ao leite humano.....	19
Tabela 2 – Consumo das diferentes dietas, durante os sete dias experimentais, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com <i>E. coli</i> O157: H7	23
Tabela 3 – Ganho de peso, durante os sete dias experimentais, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com <i>E. coli</i> O157: H7	25
Tabela 4 – Contagem de UFC em ágar MacConkey (MCC) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, a partir das fezes dos camundongos, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com <i>E. coli</i> O157: H7. Resultados expressos em valores absolutos.....	26
Tabela 5 – Contagem de UFC em ágar MacConkey (MCC) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, a partir das fezes dos camundongos, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com <i>E. coli</i> O157: H7. Resultados expressos em log UFC/grama de fezes.....	27
Tabela 6 – Enumeração da <i>E. coli</i> O157:H7 em ágar sorbitol (SORB) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, a partir das fezes dos camundongos, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com <i>E. coli</i> O157: H7. Resultados expressos em valores absolutos.....	28
Tabela 7 – Enumeração da <i>E. coli</i> O157:H7 em ágar sorbitol (SORB) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, a partir das fezes dos camundongos, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com <i>E. coli</i> O157: H7. Resultados expressos em log UFC/grama de fezes.....	29
Tabela 8 – Colônias sorbitol negativas das placas de diluição 10^{-7} coletadas após o desafio com a <i>E. coli</i> O157: H7.....	30

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito protetor das frações protéicas do soro do leite sobre as vilosidades intestinais de camundongos Balb/C, infectados por *Escherichia coli* O157:H7 amostra ATCC 43895. Oito grupos, compostos por seis fêmeas cada um, foram separados aleatoriamente e receberam dieta padrão (AIN93G) (grupo controle) e modificada (AIN93 modificada com adição das frações: alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina e concentrado protéico total) e água *ad libitum* por sete dias. Os grupos desafiados receberam alíquotas de 0,5ml de *E. coli* O157: H7, na concentração de 7×10^{10} UFC/ml por meio de cânula de gavagem. Os animais foram acompanhados clinicamente e sacrificados, no 8º dia experimental, conforme recomendações do CETEA/UFMG. As amostras das porções intestinais foram submetidas à histopatologia e morfometria. As análises estatísticas foram realizadas pela técnica de pareamento através do Teste t-Student e pelo teste ANOVA ONE WAY incluindo análise de variância e teste de comparação múltipla segundo Tukey (Software GraphPad Prism 3.0.3® - San Diego CA). As frações beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina exerceram efeito protetor sobre as vilosidades intestinais do jejuno distal e íleo ($p < 0,05$), respectivamente, em camundongos Balb/C infectados por *E. coli* O157:H7. Por outro lado, o concentrado protéico total (WPC) não demonstrou efeito protetor sobre as vilosidades intestinais. O soro do leite apresenta grande potencial para o controle de infecções intestinais causadas por *E. coli* O157:H7.

Palavras chave: soro de leite, alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina, *Escherichia coli* O157:H7, vilosidades intestinais

ABSTRACT

The effect of dietary whey protein concentrate on adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in small intestine of Balb/C mice was available. Eight groups of the six females each one, had been separate and had randomly and received diet standard (AIN93G) (control group) and modified (AIN93 modified with addition from the fractions: alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin and total whey protein concentrate - WPC) and water *ad libitum* per seven days. The blunt groups had received aliquot from 0,5ml of *E. coli* O157: H7 (ATCC 43895), in the concentration of 7×10^{10} UFC/ml by means of gavage cannula. The animals had been examined clinically and sacrificed, in 8º experimental day, as recommendations of the bioethics committee (CETEA/UFMG). The samples of the intestinal portions had been submitted to the histopathology and morphometry. The statistical analyses had been carried through by the Test t-Student and by test ANOVA ONE WAY including analysis of variance and test of multiple comparison according to Tukey (Software GraphPad Prism 3.0.3® - San Diego HERE). The fractions beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin had protective effect on the intestinal vilosity of the distal part on the jejunum and the ileum ($p < 0,05$), respectively, in Balb/C mice infected by *E. coli* O157: H7. On the other hand, the WPC did not demonstrate protective effect on the intestinal vilosity. The whey protein presents great potential for the control of intestinal infections caused by *E. coli* O157: H7.

Key-words: whey protein, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, *Escherichia coli* O157:H7, intestinal vilosity.

1. INTRODUÇÃO

Minas Gerais se coloca como o maior produtor de leite do país com 25% da produção nacional. Devido a essa vocação, o estado também se destaca na produção de derivados lácteos, incluindo-se o produto mais apreciado e de maior destaque quando se fala em Minas Gerais - o queijo. Diversas regiões do estado tradicionalmente produzem queijos, sendo as regiões do Sul de Minas e da Zona da Mata consideradas berços de muitas variedades. Com uma produção queijeira tão expressiva se obtêm uma grande quantidade de soro que é desperdiçada, sendo necessário realizar o seu aproveitamento racional.

O soro é um produto obtido na fabricação de queijos e se apresenta como um líquido amarelo-esverdeado, rico em nutrientes como proteínas, vitaminas, lactose, água e sais minerais. Além da utilização na composição de rações para animais, também pode ser incorporado em vários produtos alimentícios, cosméticos ou farmacêuticos. Este é, portanto, um produto de interesse tanto da indústria quanto dos consumidores, não só por seu valor nutricional, como também pelas aplicações para a saúde, tendo em vista que as proteínas do soro do leite podem conferir uma ação positiva na imunidade intestinal protegendo o organismo contra infecções virais e bacterianas.

Os surtos de toxinfecção de origem alimentar são atribuídos, em vários casos, a consumo de leite fresco ou produtos cárneos contaminados, principalmente se estes não recebem tratamento térmico adequado. Entre os microrganismos envolvidos nos processos de toxinfecção alimentar, a *E. coli* O157: H7, considerada um patógeno gastrointestinal, pode causar, em humanos, quadros de diarreia hemorrágica devida aos danos produzidos à mucosa intestinal pela ação de suas endotoxinas. Fator importante para a ocorrência da doença é a aderência da bactéria às células epiteliais intestinais.

Casos de toxinfecção alimentar causada por *E. coli* O157:H7 são registrados no Brasil e são freqüentemente confundidos com ocorrências de surtos de gastroenterites causados por outros coliformes. Entre os animais domésticos, bovinos podem ser considerados como portadores de *E. coli* O157: H7, servindo de fonte de infecção para humanos pela contaminação fecal de alimentos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a ingestão das proteínas do soro de leite pode diminuir os efeitos da colonização da *E. coli* O157: H7, bem como os danos causados sobre as vilosidades intestinais, em camundongos Balb/C. Também foi observada ação diferenciada que as proteínas do soro de leite poderiam apresentar, na proteção das vilosidades intestinais, frente ao desafio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A indústria queijeira representa um importante segmento do setor lácteo e, em 2006 a produção nacional, sob inspeção federal, totalizou 495 mil toneladas (Produção..., 2006). Minas Gerais por ser o estado brasileiro que mais produz leite, ou seja, dos 4,3 bilhões de litros produzidos no 1º trimestre de 2007, se destaca na produção de derivados lácteos, incluindo-se o queijo. Este produto é o mais apreciado e o de maior destaque; quando se fala em Minas Gerais, o queijo é associado às riquezas culturais do estado (Empresa, 2008). O soro representa 80% a 90% do volume total de leite utilizado na fabricação de queijos (Teixeira, 2005).

2.1 Propriedades do soro do leite

O soro é um produto obtido na fabricação de queijos e se apresenta como um líquido amarelo-esverdeado, rico em nutrientes como proteínas, vitaminas, lactose, água e sais minerais. Além da utilização na composição de rações para animais, também pode ser incorporado em vários produtos alimentícios, cosméticos ou farmacêuticos (Marek et al., 2004) e a

qualidade destes é de interesse tanto da indústria quanto dos consumidores (Ballin, 2006).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas presentes no soro são consideradas superiores às caseínas (predominantes na massa do queijo) em vários aspectos, por exemplo, na presença de aminoácidos, similares aos do leite humano e à sua alta digestibilidade, que tornam estas proteínas, recomendadas para a formulação de produtos "substitutos" ou "análogos" do leite humano em fórmulas infantis (Sindayikengera e Shui, 2006).

Aproximadamente 98% dos sólidos totais do soro são representados pelas proteínas e, dentre elas, estão alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina, albumina sérica e as imunoglobulinas, que podem ser utilizadas em formulações para dietas de controle de peso (Prudêncio e Benedet, 1999) e bebidas lácteas a base de frutas, para praticantes de atividade física (Camargo et al., 2000).

Tais proteínas, que são consideradas benéficas à saúde (Boaglio et al., 2006), podem conferir uma ação imunomoduladora, antiviral (Wolber et al., 2005), antioxidante, anti-hipertensiva, anti-tumoral e antibacteriana, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Kume et al., 2006). Estudos com animais mostraram que as proteínas do soro, em comparação a outras fontes protéicas (como carne vermelha, soja e caseína) têm ação contra tumores de cólon, induzidos por carcinógenos, embora seus mecanismos de ação ainda não estejam totalmente explicados (Belobrajdic et al., 2003).

Segundo Wolber et al. (2005), o concentrado de proteínas do soro -"WPC", por meio de seus ingredientes bioativos, pode ativar células do sistema imunológico e/ou prevenir infecções pelo rotavírus diminuindo a diarreia causada por este microrganismo. Entretanto Kume et al. (2006) mostraram que a suplementação utilizando proteínas do soro pode auxiliar na prevenção do desenvolvimento de hepatite em ratos.

2.2 Toxinfecções alimentares causadas por *E. coli* O157: H7

Os surtos de toxinfecção de origem alimentar são atribuídos, em vários casos, ao consumo de produtos cárneos ou leite fresco contaminados, principalmente se estes não recebem tratamento térmico adequado (Marek et al., 2004). Entre os microrganismos envolvidos nos processos de toxinfecção alimentar, a *E. coli* O157: H7, considerada um patógeno gastrointestinal, pode causar, em humanos, um quadro clínico caracterizado por cólicas abdominais intensas e diarreia, inicialmente líquida, mas que se torna hemorrágica na maioria dos casos, através da produção de toxinas, provocando dano severo à mucosa intestinal (Ceponis et al., 2005). A doença tem duração de 5 a 10 dias e, aproximadamente, 15% das infecções, especialmente em crianças menores de cinco anos e idosos, podem apresentar uma complicação chamada síndrome hemolítica urêmica - SHU, caracterizada por destruição das células vermelhas do sangue e insuficiência renal, sendo que a infecção também pode causar um quadro de trombocitopenia trombótica púrpura - TTP, caracterizada por anemia (Dean-Nystrom et al., 1997; Reiss et al., 2006).

A ocorrência de doenças de transmissão alimentar (DTA) vem aumentando tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Embora seja difícil estimar a incidência global de DTA, relata-se que em 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram devido à diarreia, maior causa de má nutrição em crianças. No Brasil, a primeira cepa de *E. coli* O157:H7 isolada foi identificada em Parelheiros, no estado de São Paulo, a partir de uma amostra de água de poço, em uma chácara. Não há dados sistematizados sobre a *E. coli* O157:H7 no Brasil e nem sobre a SHU. Um estudo vem sendo conduzido no Estado de São Paulo para conhecer a situação do patógeno e da síndrome e estabelecer pontos de referência para a implantação de um sistema adequado de vigilância e prevenção. Da avaliação de diagnósticos no período entre 1998 a 2.000, no Estado de São Paulo, 12 casos são de SHU, com

história anterior de diarreia e de possível associação com a *E. coli* O157. Na Universidade Federal de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, um estudo retrospectivo de casos de SHU ocorridos no Hospital Universitário, no período de março de 1987 a agosto de 1999 apontou a existência de 25 casos da doença em crianças, com idade variando entre dois meses a quatro anos de idade. A infecção humana por *E. coli* O157:H7 e outras TTSh (*E. coli* produtora de toxina tipo *Shiga*) tem sido registradas em mais de 30 países. A maior incidência de SHU é na Argentina, onde a enfermidade é endêmica sendo que o Comitê de Nefrologia da Sociedade Argentina de Pediatria registra aproximadamente 250 casos novos por ano. Em 1998 a incidência foi de 8,2 por 100.000 em crianças menores de 5 anos (Doenças..., 2007). Bactérias patogênicas contribuem com aproximadamente 60% das doenças de origem alimentar que levam as hospitalizações (Garcia, 2006).

2.3 Características da *E. coli* O157: H7

A *E. coli* faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo o homem e, dentre elas, algumas linhagens patogênicas, como a O157:H7, podem causar diarreia (Santiago, 2005) que pode progredir para uma colite hemorrágica (Raji et al., 2006). O primeiro mecanismo para o desenvolvimento da doença é a aderência da bactéria nas células epiteliais intestinais. Após a colonização, podem ocorrer mudanças histológicas na mucosa podendo levar a uma lesão que tem como característica o achatamento das vilosidades (Nagano et al., 2003).

Em aproximadamente 10% dos casos, o tratamento com antibióticos pode aumentar o risco de desenvolvimento da síndrome urêmica hemolítica (Gamage et al., 2006) posto que o antibiótico pode, por exemplo, liberar em abundância as toxinas do periplasma da bactéria presente no lúmen intestinal, resultando em aumento da toxina levada à circulação sistêmica e apresentação às células endoteliais vasculares susceptíveis no glomérulo renal (Ceponis et al., 2005).

Este microrganismo pode ser isolado do trato gastrointestinal de bovinos, considerados reservatórios primários (Bach et al., 2005), sendo que a porção terminal do reto é considerada, nestes animais, o local preferencial de colonização do microrganismo (Low et al., 2005) que pode estar presente em níveis que atingem de 10^2 a 10^5 unidades formadoras de colônias - UFC/ grama de fezes. Estudos mostram que a *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em animais como bovinos adultos e ovinos por períodos que excedem 60 dias (Bach et al., 2005) sem causar nenhum sintoma; ocasionalmente, em bezerros, podem causar diarreias. A transmissão entre pessoas também pode acontecer e, geralmente, está relacionada à higiene inadequada. Ocorre, provavelmente, pela rota oral-fecal e tem sido documentada em pequena escala na maioria dos surtos; esta é considerada o modo dominante de transmissão em creches (Garcia, 2006).

Pode, também, produzir toxinas que induzem às mudanças microvasculares *in vivo*, citotoxicidade em células *in vitro* e lesões em intestinos de aves, suínos e coelhos, podendo, também, causar paralisia e morte em camundongos (Dean-Nystrom et al., 1997). Modelos animais utilizando camundongos Balb/C convencionais tratados com antimicrobianos (Ceponis et al., 2005), são usados para estudos de colonização de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) em seus intestinos (Nagano et al., 2003).

3.1 Morfologia e Bioquímica

A bactéria *E. coli* O157: H7, emergente nas últimas décadas, é um importante patógeno causador de DTA. Apresenta-se morfológicamente como bastonete Gram-negativo, entérico, anaeróbio facultativo que coloniza o epitélio intestinal e apresenta motilidade devido à presença de flagelo. Caracteriza-se bioquimicamente como sorbitol negativo, MUG negativo (enzima B-glucoronidase não é fenotipicamente expressa), oxidase negativa, Voges-Proskauer negativo, citrato negativo, indol positivo, motilidade positivo, formação de gás positivo e catalase positivo. É um

indicador de contaminação fecal e apesar de sua incidência relativamente baixa, apresenta sérias conseqüências para a saúde sendo, algumas vezes, fatal, particularmente para crianças e idosos. A *E. coli* O157:H7 pode apresentar resistência aos antimicrobianos amoxicilina, trimetoprim+sulfa, amoxicilina+ ácido clavulânico e algumas quinolonas como ácido nalidíxico e ciprofloxacina sendo que após tratamentos com antibióticos os níveis de Shiga toxina livre in vivo podem aumentar facilitando a progressão da doença (Bidet al., 2005).

Por sua incapacidade de produzir β -glicuronidases (não hidrolisa o 4-metil-umbeliferi-D-glicuronídeo) a mesma não pode ser detectada nas análises para coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP). Em todo o mundo, a *E. coli* O157:H7 é isolada em numerosos surtos e casos envolvendo colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU). Mais de 10% dos pacientes com colite hemorrágica devido à infecção com a *E. coli* O157:H7 desenvolvem a SHU que causa sérios danos aos rins (Dean-Nystron et al., 2003).

Os isolados são sorologicamente diferenciados com base nos três principais antígenos de superfície: antígeno O (somático), antígeno H (flagelar) e antígeno K (capsular). Atualmente, 174 antígenos já foram identificados. A bactéria é assim denominada porque expressa o 157^o antígeno somático (O) identificado, assim como o 7^o antígeno flagelar (H). Foi primeiramente identificada como um patógeno em 1983, nos EUA, devido à diarreia sanguinolenta que afetou 47 pessoas que consumiram hambúrgueres contaminados. Desde então passou a ser considerado um patógeno entérico de importância em saúde pública. Atualmente, a classificação dentro de grupos específicos baseia-se não só nos mecanismos de patogenicidade, como também na virulência da cepa e nos distintos sorogrupos O: H. Estes grupos incluem: cepas enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), difuso-aderentes (DAEC),

enteroagregativas (EaggEC) e enterohemorrágicas (EHEC). Os causadores de diarreia são EPEC e ETEC; porém nos últimos anos, as EHEC foram associadas a muitos casos de síndromes clínicas, principalmente àquelas ligadas ao consumo de leite, carnes e derivados (Garcia, 2006).

Outra característica importante do sorotipo O157: H7, é que 93% das *E. coli* fermentam o sorbitol (SORB+), mas aquelas pertencentes ao sorotipo O157: H7 não são fermentadoras do sorbitol (SORB-) (March et al., 1986; Bouvet e Vernozy- Rozand, 2000; Nagano et al., 2003).

2.3.2 Termotolerância, acidez e enterotoxinas

Estudos com relação ao crescimento *E. coli* O157:H7 mostram que a mesma cresce rapidamente entre temperaturas de 30 e 42°C, com tempos de geração variando de 0,49h à temperatura de 37°C e até 0,64h a 42°C. Este microrganismo cresce pobremente à temperatura de 44–45°C, e não cresce em 48 horas à temperatura de 10°C ou 45,5°C. A pasteurização do leite (72°C por 16 segundos) é um tratamento eficiente para inativação mais de 10⁴ células por ml da *E. coli* O157: H7.

Em produtos cárneos é necessário que a temperatura interna do alimento atinja pelo menos 68,3°C e apesar do patógeno ser destruído com a pasteurização, ele pode tolerar uma concentração de sal de 8,5%. Tanto a bactéria quanto suas toxinas são destruídas por cozimento ou pasteurização adequadas. Por outro lado, este patógeno é capaz de sobreviver sob temperaturas de refrigeração e congelamento. Assim leites crus e derivados, contaminados após a pasteurização, podem representar um meio de sobrevivência e crescimento deste patógeno (Garcia, 2006).

Alimentos ácidos (pH < 4,6) segundo FDA (Food and Drug Administration) são geralmente considerados de baixo risco para a transmissão de bactérias patogênicas, porém, *E. coli* O157: H7, sob certas condições, pode sobreviver a um pH

tão baixo quanto 2,0 e pode persistir por muitas semanas em alimentos como suco de maçã e maionese. A bactéria também pode sobreviver durante a fermentação e estocagem de iogurtes. O mecanismo responsável pela capacidade deste microrganismo tolerar ambientes ácidos não está completamente elucidada, mas parece estar associado com proteínas que podem ser induzidas pela própria acidez. A tolerância do microrganismo ao ácido tem sido previamente documentada. Em experimento realizado por (Marek et al., 2004) foi demonstrado que *E. coli* O157:H7 sobrevive na presença de baixo pH e alta acidez produzida por bactérias lácticas durante a fabricação de queijo "cottage". Em relação à fermentação, desidratação, e estocagem de embutidos fermentados a pH 4,8 esta bactéria pode sobreviver por mais de dois meses. Estudos determinaram que nem o ácido acético, cítrico ou láctico em concentrações até 1,5% e aplicados em carnes a 20 ou 55°C reduzem apreciavelmente a contagem de *E. coli* O157:H7. A bactéria se caracteriza como um patógeno entérico não invasivo que elabora toxinas codificadas por fagos.

Algumas cepas de *E. coli* e outras espécies bacterianas produzem enterotoxinas, que são proteínas com modo de ação diferenciado: as enterotoxinas citotóxicas e as citotônicas. As primeiras matam as células eucariotas, inibindo a síntese protéica e as outras destroem o metabolismo celular em locais específicos, por exemplo, elevando o nível de nucleotídeos. As EHEC produzem fatores citotóxicos que são descritos como verotoxinas (vtx) por serem tóxicas para culturas de células Vero ou como toxinas tipo shiga (TTSh), devido à semelhança entre Verotoxina 1 (Vt1) e a Shiga Toxina (ShT) produzida pela *Shigella dysenteriae*. As *E. coli* podem ser produtoras de Verotoxinas (vtx) ou de Toxinas Tipo Shiga (TTSh) e ambas podem ser destruídas por pasteurização. A ShT produzida por *Shigella dysenteriae* foi descrita pela primeira vez em 1903 e as TTSh, produzidas por *E. coli* foram descobertas em 1971. Estas toxinas são proteínas com uma larga subunidade A (porção ativa) e cinco pequenas

subunidades B, as quais se ligam ao receptor de superfície da célula denominado Gb₃ (ceramida globotriosil), que é um glicopeptídeo de função desconhecida encontrado na membrana de células eucariotas. Após ligação e internalização, a subunidade ativa catalisa a destruição do RNA ribossomal, inibindo a síntese protéica. O receptor Gb₃ ou CD77 está presente, nas células Vero e no tecido renal humano (Garcia, 2006). Ambas compartilham o mesmo receptor e apresentam estrutura e modo de ação similar. O gene codificador da TTSh I é imunológica e geneticamente indistinguível ao da ShT, enquanto o gene da TTSh II apresenta 50% de homologia ao da TTSh I. Estas duas toxinas (I e II) são distintas antígenicamente e diferem em seus efeitos biológicos: TTSh II é menos tóxica às células Vero (uma linha celular pertencente ao rim dos macacos cinza africanos), porém mais tóxicas para camundongos e causa colite hemorrágica em coelhos adultos, enquanto TTSh não. O grupo EHEC tem mais de 60 sorotipos produtores de TTSh sendo que a *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais comumente associado em episódios de doenças em humanos e a EHEC mais estudada em produtos de origem animal. É interessante ressaltar que a *E. coli* O157:H7 isolada de pacientes com colite hemorrágica produzem TTSh-I ou apenas TTSh-II. Isolados produzindo apenas TTSh-I são raros (Garcia, 2006).

A *E. coli* O157:H7 pode sobreviver a 22°C por períodos de até 84 dias em fezes de bovinos indicando-as como um potencial vetor para transmitir tal microrganismo. Investigações de surtos sugerem que a infecção pode ser resultado do contato com o ambiente (solo e água) contaminado com fezes de bovinos ou ovinos (Bach et al., 2005).

2.3.3 Fatores de virulência

A *E. coli* O157:H7 apresenta três fatores de virulência relacionados à sua patogenicidade. O primeiro é a produção de citotoxinas tipo shiga (TTSh I e II). Outro fator de virulência é a hemolisina localizada em plasmídeo. O terceiro fator inclui a capacidade deste microrganismo em aderir

e colonizar a mucosa intestinal através do gene *eae*, usado como marcador para a ilha de patogenicidade LEE, envolvido na produção de lesões que codifica a proteína de membrana intimina. Este gene está envolvido na destruição de enterócitos e está, em muitos casos, ligado à patologia da síndrome hemolítica urêmica (SHU). Um exemplo da aquisição do material genético pela *E. coli* O157:H7 é a sua ilha de patogenicidade, ao qual é referida como locus LEE (locus para “effacement” e extinção do enterócito) que é inserido no genoma da bactéria. O baixo conteúdo de bases nitrogenadas G+C da ilha de patogenicidade LEE sugere que a aquisição do “cassete” de virulência originalmente ocorre por transmissão horizontal da ancestral *E. coli* O55. A LEE contém genes que codificam um sistema de secreção tipo III, que serve como uma “seringa molecular” para entregar proteínas derivadas da bactéria no citosol da célula do hospedeiro para a qual o *bacterium* se ligou. Uma das proteínas bacterianas, Tir ou EspE, serve como um receptor para ligar-se a outra proteína de membrana chamada intimina, ao qual é codificada pelo gene *eae* também

presente na ilha LEE. Em modelos animais e em testes de culturas de tecido *in vitro*, bactérias contendo o locus LEE aderem intimamente à superfície das células infectadas. Abaixo da bactéria aderente, o citoesqueleto da célula eucariótica é reorganizado dentro de uma lesão A/E (“attaching-effacing”) em que as microvilosidades de superfície são rompidas e a F-actina é recrutada dentro de um “pedestal” diretamente abaixo da bactéria aderente (Fig. 1). Proteínas associadas à F-actina, como a proteína ligante alfa-actina, também são recrutadas para o pedestal da lesão A/E. Fagos que codificam as toxinas são inseridos no genoma da *E. coli*, incluindo O157: H7. Estas toxinas foram primeiramente identificadas por seus efeitos citopáticos nas células Vero sendo, portanto, denominadas Verotoxinas. A Verotoxina-1 é altamente homóloga a ShT elaborada pela *Shigella dysenteriae*, apresentando-se multimérica, abrangendo uma subunidade (A) ativa e cinco subunidades (B) ligantes, que se liga a Gb3 na superfície de certas, mas não de todas, as células hospedeiras (Ceponis et al., 2005).

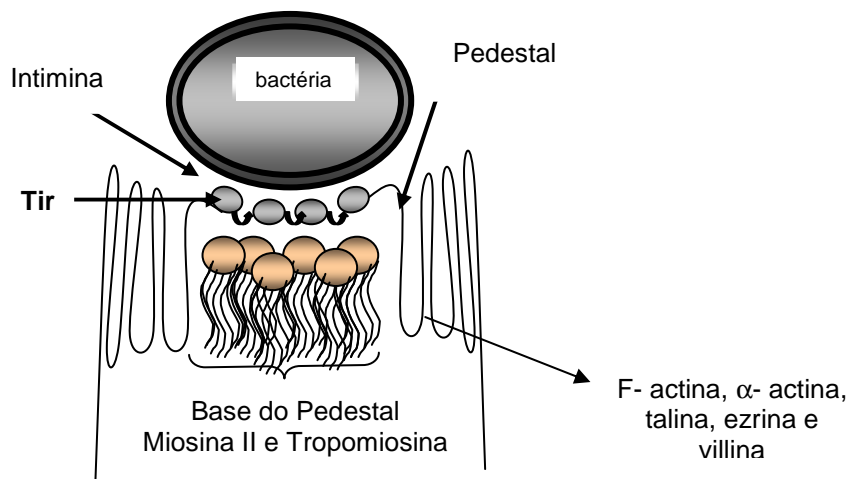


Figura 1 - Sinais de transdução do hospedeiro afetados pela infecção de *E. coli* (Adaptado de Vallenge e Finlay, 2000).

O lipopolissacarídeo (LPS) também pode ser responsável pela regulação direta de Gb3 ou CD77 (o receptor da toxina shiga nos tecidos alvo) ou a ação pode ser direta através da indução de fator de necrose tumoral (TNF- α) e outras citocinas pró-inflamatórias sendo que a ação de LPS e da ShT pode ser sinérgica. A molécula de LPS possui três domínios principais – o polissacarídeo antígeno específico “O”, o oligossacarídeo “ligante”, ao qual é antigênico, e o lipídeo A. O último domínio é razoavelmente bem conservado entre os diferentes gêneros e é responsável por muitas das atividades biológicas da molécula. Existem cerca de 160 sorotipos diferentes de *E. coli*, cada um com um diferente polissacarídeo “O” e mesmo dentro de um sorotipo existe uma heterogenicidade de cadeias ao longo da extensão do polissacarídeo. O oligossacarídeo “ligante”, que liga o lipídeo A ao polissacarídeo “O” pode ser de cinco tipos, denominados R1-R4 e K12. O tipo R1 tem sido o mais comum no LPS de linhagens de *E. coli* e o tipo R3 mais incomum. O “core” completo oligossacarídeo-lipídeo é naturalmente expressado na bactéria, sendo acessível ao anticorpo sendo que o sistema imune da mucosa gastrointestinal pode proteger contra respostas mediadas por LPS (Currie et al., 2001).

2.3.4 Morte celular programada

As toxinas tipo shiga também induzem a morte programada das células. Dentro de 24 a 48 horas de exposição às toxinas, as células demonstram características morfológicas de apoptose, incluindo retração da célula, bolhas de membrana e condensação da cromatina nuclear. As características morfológicas de apoptose são acompanhadas pela fragmentação do DNA, ativação das caspases e degradação da PARP (polimease poly-ADP-ribose) enzima reparadora do ácido desoxirribonucléico. Características indicativas da ativação da resposta apoptótica (McKee et al., 1995).

Após a ligação na membrana plasmática da célula do hospedeiro, *E. coli* O157:H7

enterohemorrágica utiliza um sistema de secreção tipo III codificado na ilha de patogenicidade LEE para injetar proteínas efetoras dentro do citosol da célula eucariótica infectada. O efector, EspE se liga à proteína de membrana intimina levando definitivamente a rearranjos de citoesqueleto das células do hospedeiro, formação de pedestais abaixo da bactéria intimamente aderente e à lesão “attaching-effacing”. Este processo envolve a ativação de moléculas sinalizadas no citosol de células eucarióticas infectadas, incluindo a fosfatidil-inositol-3-quinase, fosforilase C e 5 lipoxigenase. Estimulação da proteína C quinases e cadeias de miosina quinases mediadas aumentam a permeabilidade paracelular induzida pela infecção pela *E. coli* O157:H7. Toxinas tipo shiga interagem com o receptor de superfície CD77 (ou gangliotriasilceramide-Gb3) presentes em microdomínios enriquecidos de colesterol na membrana plasmática das células eucarióticas para iniciar a via sinalizadora. As toxinas tipo shiga induzem a morte celular programada pela liberação de citocromo C (cyt c) da mitocôndria, ativação das caspases pro-apoptóticas, incluindo caspase-3, caspase-8 e caspase-9 e degradação de enzima reparadora de DNA. A *E. coli* enterohemorrágica também induz ativação de MAP quinases e fatores de transcrição nuclear (NF- κ B e AP-1) para induzir a produção e secreção de quimocina interleucina-8, a qual serve como um potente quimioatrativo que entrega neutrófilos para o local da infecção bacteriana. Este processo pode ser mediado, pelo menos, em parte pela interação da flagelina bacteriana com receptor expressado na superfície basolateral da célula epitelial (Ceponis et al., 2005).

2.3.5 Patogenicidade

Em modelos animais, incluindo coelhos, leitões gnotobióticos, bezerros, cães e camundongos pré-tratados com antibióticos, desafiados com EHEC, foi observada uma inflamação com predominância de infiltrados de neutrófilos dentro da lâmina própria do cólon. Na mucosa intestinal de humanos

infectados, achados de biópsias mostraram um infiltrado neutrofílico dominante, com evidência de formação de pseudomembrana comparada à observada em colite pseudomembranosa induzida por *Clostridium difficile*. Patógenos gastrointestinais, invasivos ou não, podem induzir respostas inflamatórias no hospedeiro por serem capazes de “simular” eventos de transdução de sinais em células epiteliais infectadas (Ceponis et al., 2005).

A aderência intestinal da bactéria acontece via formação de *pilus* ligante (FPL) sendo que o contato subsequente é mediado por outra proteína de membrana chamada intimina. Este processo leva ao achatamento das vilosidades do enterócito formando uma lesão conhecida como “attaching and effacing”. A habilidade das amostras de *E. coli* causadoras de diarreias para aderir e colonizar o intestino faz parte do processo de desenvolvimento da doença. (Araújo e Giugliano, 2001).

O mecanismo de patogenicidade da *E. coli* O157:H7 não está totalmente esclarecido. Existem indicações de que ele cause doença devido à habilidade de aderir à membrana celular do hospedeiro e produzir TTSh-I e/ou TTSh-II. Estes fatores de aderência levam à ocorrência de lesões chamadas A/E e são caracterizadas por ligação da bactéria nas células intestinais, com destruição de vilosidades e acúmulo de filamentos de actina no citoplasma subjacente. Uma vez que as vilosidades são destruídas, pode ser instalado o quadro de diarreia não-sanguinolenta (Garcia, 2006).

2.4 Características da doença causada por *E. coli* O157: H7

A doença causada em casos de infecção por *E. coli* O157:H7 em humanos apresenta manifestações clínicas que variam desde ausência de sintomas até a morte. Os principais sintomas são: diarreia não-sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (SHU), púrpura trombocitopenia trombótica (PTT) ou até mesmo quadro assintomático (Garcia, 2006).

A síndrome hemolítica urêmica, primeiramente descrita em 1955 na Suíça teve três características clínicas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falência renal aguda. Pode ocorrer em todas as faixas etárias, mas é mais comum em bebês e crianças e é a maior causa de falha renal na infância. Outros patógenos, dentre eles *Shigella dysenteriae* tipo I, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae*, são considerados agentes suspeitos de SHU, mas *E. coli* O157:H7 é considerada a causa primária (Garcia, 2006).

A PTT pode ocorrer ou não nos casos de SHU e é caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, doença neurológica, doença renal e febre (Garcia, 2006).

2.4.1 Faixa etária da doença

Bebês, crianças e idosos correm maiores riscos de infecção por *E. coli* O157: H7. A prevalência é maior em crianças abaixo de cinco anos, decresce com o avanço da idade e volta a aumentar novamente em pessoas acima de 65 anos. Outras complicações da doença incluem dilatação anal e morte. Dentre as causas de morte reportadas em idosos, incluem-se SHU, PTT, colites, edema pulmonar, efusão pulmonar, pneumonia, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e bacteremia. A probabilidade de complicações pode ser determinada por fatores do hospedeiro, dose infectante (geralmente 10^6 - 10^8 microrganismos/g ou ml) ou por característica da cepa infectante (Garcia, 2006) já que uma única cepa da *E. coli* O157:H7 pode produzir o quadro completo da doença incluindo diarreia com ou sem sangue, SHU e PTT (Doenças..., 2007)

2.4.2 Período de incubação

O período de incubação médio da doença é de três dias, podendo variar entre um e oito dias. A maioria dos pacientes com colite hemorrágica melhora espontaneamente

após sete dias. Vômitos ocorrem em 30-60% dos casos, e febre, geralmente baixa, acontece em 30% dos pacientes. A SHU é diagnosticada, normalmente, após seis dias do início do quadro de diarreia onde 50% dos pacientes precisam fazer diálise e 75% necessitam de transfusão sangüínea. Complicações neurológicas agudas, como o coma, desenvolvem-se em 25% dos pacientes. Complicações raras incluem pancreatite, *diabetes mellitus*, efusão pleural ou do pericárdio. Dos pacientes com SHU, 3-5% chegam a óbito (Garcia, 2006).

Em surtos em enfermarias e casas de custódia, o período de incubação tende a ser mais longo, pois alguns casos são, provavelmente, o resultado da difusão pessoa à pessoa, através de uma pequena inoculação (Doenças..., 2007)

A colite hemorrágica causada por *E. coli* O157:H7 é caracterizada por fortes dores abdominais, sangue nas fezes, pouca ou nenhuma febre e evidência de edema da mucosa colonizada, erosão ou hemorragia com ausência de patógenos convencionais nas fezes. A doença típica começa com diarreia sem sangue e fortes dores abdominais sendo que a forma mais branda da doença apresenta diarreia sem sangue. As fezes normalmente se tornam sanguinolentas no segundo ou terceiro dia da doença. O sangue começa como estrias nas fezes e terminam por compor toda a massa fecal. A doença, muitas vezes, resulta em hospitalização (Garcia, 2006).

2.4.3 Tratamento

Indica-se, como suporte geral, o uso de glicocorticóides e hidratação. A maioria das pessoas se recupera sem antibióticos ou outro tratamento específico, em 5 a 10 dias. Em casos mais graves, pode ser necessário transfusão de sangue e diálise, no caso de falência renal. Estudos têm mostrado que os agentes anti-diarréicos deveriam ser evitados e que os antibióticos não têm melhorado o curso da doença, sendo que alguns podem agravar a doença renal (Doenças..., 2007).

2.5 Funções imunológicas das proteínas do soro

2.5.1 Alfa-lactalbumina (α -Lg) e beta-lactoglobulina (β -Lg)

“Proteína do leite” é um termo genérico para diferentes grupos de proteínas contidas no leite. A caseína após torna-se insolúvel em um pH 4,6, pode ser separada. Esta pode se tornar solúvel pela reação com álcali para obtenção dos caseinatos. As proteínas que permanecem em solução após a obtenção das caseínas (no caso, após a fabricação de queijos) são chamadas proteínas do soro (Welch et al., 1997). As proteínas do soro diferem das caseínas porque são menores, globulares, compactas, solúveis em ampla faixa de pH, termolábeis e não coaguláveis pela renina, além de possuírem propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas. A β -lactoglobulina (β -Lg), a α -lactalbumina (α -Lg) e as imunoglobulinas, representando 98% do total de proteínas solúveis do leite (Soares, 2002). Correspondem, respectivamente, por aproximadamente 60% e 30% do total de proteínas tendo ponto isoelétrico entre 4,9 e 5,4 e podem ser separadas pelo processo de cromatografia (Boaglio et al., 2006). Também estão presentes, só que em menor quantidade, alguns peptídeos de baixo peso molecular como a lactoferrina e a lactoperoxidase (Boaglio et al., 2006).

As β -Lg e as α -Lg podem demonstrar funções biológicas. A β -Lg, por exemplo, é capaz de se ligar a moléculas hidrofóbicas e pode funcionar *in vivo* como um mecanismo de transporte de retinol para o intestino delgado. Também se liga aos ácidos graxos e pode estimular a atividade das lipases. A α -Lg é uma proteína moduladora de cálcio e pode ser um agente anti-tumoral *in vitro* (Welch et al., 1997).

As proteínas do soro possuem uma alta concentração de cisteína (4,6 vezes mais que a carne vermelha). Quando processadas em baixas temperaturas, contêm altas concentrações de dipeptídeos específicos (glutamilcisteína) (Welch et al., 1997) que podem promover a síntese de

glutationa no fígado. Esta síntese pode aumentar a detoxicação de radicais livres (efeito antioxidante) e melhorar o reparo e proteção celular e, inibir os efeitos produzidos pelo metabolismo de componentes carcinógenos que podem induzir danos genéticos (Belobrajdic et al., 2003).

Produtos lácteos representam os maiores componentes da alimentação humana e sua qualidade é preocupação dos consumidores, autoridades governamentais de controle, fabricantes e produtores (Ballin, 2006).

2.5.2 Concentrado protéico de soro “WPC”

Segundo Soares (2002), o WPC (concentrado de proteínas do soro) contém 35 a 75% de proteínas. É considerado versátil em função de sua boa solubilidade, absorção de água, geleificação, aeração e propriedades nutricionais. Promove também nos alimentos o gosto suave, a capacidade tampão, a coagulabilidade pelo calor, capacidade de formar espuma, baixa viscosidade, solubilidade em soluções

ácidas, alcalinas ou salgadas. O “WPC” pode ter uma composição muito variável e por esta razão é normalmente comercializado com base no teor protéico. Apresenta também 8,3% de gordura, 4,9% de lactose e 4,2% de umidade. Outros componentes como a lactose, esfingolípídeos ou ácido linoléico conjugado podem fornecer alguma proteção contra carcinogênese quimicamente induzida (Belobrajdic et al., 2003).

A composição de aminoácidos no leite humano, segundo a FAO/WHO (1985) citada por Sindyikengera et al. (2006) está na tabela 1.

O WPC contém alta concentração de leucina, isoleucina, lisina, treonina e baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Por isso ele é utilizado para formulação de produtos substitutos do leite humano, em fórmulas infantis. Pode, também, ter efeito antiviral e imunomodulatório melhorando as funções imunológicas (Wolber et al., 2005).

Tabela 1 – Conteúdo de aminoácidos essenciais no concentrado protéico de soro “WPC” em relação ao leite humano

Aminoácidos Essenciais (mg/g de proteína)	Leite humano	FAO/WHO 1985*	WPC 80%
Isoleucina	49	28	49,7
Leucina	91	66	106,6
Lisina	65	58	88,1
Treonina	44	34	68,7
Valina	52	35	18,4

FAO/WHO 1985 requerimentos protéicos em idade pré-escolar
Adaptado de (Sindyikengera et al., 2006)

Segundo Low et al. (2003), o WPC incluído na dieta pode exercer efeito sobre a resposta primária e secundária de anticorpos em camundongos Balb/C imunizados. Outros componentes da dieta, incluindo minerais em quantidades traço, vitaminas, ácidos nucléicos, ácidos graxos essenciais e microrganismos probióticos mostraram certa modulação das respostas

imunes e celulares. Sabe-se também, que uma nutrição apropriada de proteínas pode auxiliar na competência do sistema imune.

A imunidade da mucosa no trato gastrointestinal (TGI) é a defesa primária contra patógenos que chegam ao organismo por esta via. A susceptibilidade do indivíduo às doenças pode ser

influenciada pela imunidade local da mucosa e a do trato TGI, que em alguns casos, podem ser mais importantes do que a sistêmica (Currie et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas e Diagnóstico em Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária e nos Laboratórios de Patologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

3.2 Amostra de bactéria utilizada

Amostra padrão de *E. coli* O157: H7 (EHEC), INCQS 00171, origem CDC EDL-933, lote 1101171, ATCC 43895, sorologia O157: H7 foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (RJ).

3.3 Cultivo da amostra de *E. coli* O157: H7

A amostra de *E. coli*, após ser testada quanto às suas características morfológicas e bioquímicas, foi congelada a -80°C (Gagnon et al., 2006), em alíquotas de 1ml em caldo BHI (Brain Heart Infusion - Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) com 20% de glicerol estéril (Nagano et al., 2003).

Após o descongelamento, a amostra de *E. coli* O157:H7 foi plaqueada por estriamento em Ágar MacConkey Sorbitol (SORB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) e incubada em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período a “massa” da bactéria foi “raspada” da placa e colocada em caldo Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) estéril (Marek et al., 2004) e mantido em estufa bacteriológica a 37°C , por mais 48 horas. A este caldo já turvado pelo crescimento bacteriano, foram acrescentados mais 150ml de caldo TSB estéril (para promover uma nova ativação das células bacterianas) sendo reincubado por mais 24 horas a mesma temperatura.

Esta suspensão foi colocada sob agitação a 70 r.p.m., em “shaker” (Controlled Environment Incubator Shaker - New Brunswick Scientific CO. INC, N.J./U.S.A.) a 37°C por 20 horas. Após esta fase as culturas foram sedimentadas por centrifugação (2.000 g por 10 minutos) a 10°C , desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi submetido a dois lavados, seguidos de centrifugação, em 10ml de PBS (phosphate-buffered solution) estéril, pH 7,4. A população bacteriana foi determinada por semeadura de 0,01ml das diluições decimais seriadas em água peptonada a 1%, em placas de ágar Tryptic Soy (TSA, Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) (McKillip et al., 2000) e incubadas a 37°C por 24 horas (Marek et al., 2004).

3.4 Animal experimental

O uso de animais para experimentação foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) com nº de protocolo 120/2007.

Foram utilizados camundongos BALB/C fêmeas (Funatogawa et al., 2002; Low et al., 2003; Nagano et al., 2003; Afuwape, 2004; Sfeir et al., 2004), pesando entre 8-13 gramas, fornecidos pelo biotério (IC-BIO) – ICB-UFMG. Os camundongos foram pesados no início do experimento (dia zero) para separação dos grupos segundo o delineamento em blocos ao acaso. As pesagens subsequentes foram feitas nos dias 1^o, 3^o, 5^o e 7^o.

3.5 Triagem e inoculação dos camundongos

Os animais passaram por um teste de triagem antes da inoculação com a *E. coli* O157: H7. Nos dias -3, -2 e -1 coletou-se 1 grama de fezes dos mesmos, que foram submetidas as diluições decimais de forma seriada e 100 microlitros foram plaqueados em ágar MacConkey Sorbitol (SORB). Os camundongos que deram entrada no experimento foram aqueles que não apresentaram colônias sorbitol negativo na triagem.

No dia -1, após a coleta de fezes, os camundongos receberam água com estreptomicina na concentração de 5g/litro (Dean-Nystron et al., 2003) durante as 24h, antes da inoculação com a bactéria. A intenção foi diminuir a microbiota intestinal pré-existente já que a *E. coli* O157:H7 apresenta resistência a este antimicrobiano (Gamage et al., 2006) No dia zero, após os animais ficarem 12h sem alimentação, alíquotas de 0,5ml de *E. coli* O157: H7, na concentração de 7×10^{10} UFC/ml, foram inoculadas nos animais, por via oral, utilizando cânula de gavagem, através do esôfago (Nagano et al., 2003; Afuwape et al., 2004). Os animais foram mantidos em gaiolas próprias, com dieta controlada e acesso livre a água (Kume et al., 2006).

3.6 Fontes protéicas: alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina e concentrado protéico de soro - "WPC".

As proteínas utilizadas foram fornecidas pelos detentores da patente US 6,900,290 B2 de 31 de maio de 2005 (Winsconsin Alummi Research Foundation, Madison, WI, USA) (Fonseca et al., 2005).

A dieta AN93G padrão (Anexo I) é formulada para camundongos em crescimento e contém amido de milho, caseína ($\geq 85\%$), sacarose, óleo de soja, celulose, minerais, vitaminas, L-cistina, bitartarato de colina e antioxidante TBHQ (tert-butylhydroquinona) (Reeves, 1997). Esta dieta foi modificada, substituindo sua fonte protéica, caseína, pelas outras proteínas estudadas, obedecendo à mesma concentração e proporção (Anexo II) (Belobrajdic et al., 2003; Kume et al., 2006) .

3.7 Separação dos grupos experimentais

Os grupos, separados aleatoriamente com 6 (seis) fêmeas Balb/C, pesando entre 8-13 gramas, receberam dieta controlada e água *ad libitum* por 7 dias. As proteínas foram testadas seguindo o seguinte esquema:

Grupo 1

Dieta AIN93 G padrão + gavagem de 0,5ml soro fisiológico estéril

Grupo 2

Dieta AIN93 G padrão + gavagem de 0,5ml de *E. coli* O157:H7 em concentração de 7×10^{10} UFC/ml

Grupo 3

Dieta modificada SEM CASEÍNA + gavagem de 0,5ml de soro fisiológico + α -Lactalbumina (mesma proporção da caseína)

Grupo 4

Dieta modificada SEM CASEÍNA + gavagem de 0,5ml de *E. coli* O157:H7 em concentração de 7×10^{10} UFC/ml + α -Lactalbumina (mesma proporção da caseína)

Grupo 5

Dieta modificada SEM CASEÍNA + gavagem de 0,5ml de soro fisiológico + β -Lactoglobulina (mesma proporção da caseína)

Grupo 6

Dieta modificada SEM CASEÍNA + gavagem de 0,5ml *E. coli* O157:H7 em concentração de 7×10^{10} UFC/ml + β -Lactoglobulina (mesma proporção da caseína)

Grupo 7

Dieta modificada SEM CASEÍNA + gavagem de 0,5ml de soro fisiológico + "WPC" (mesma proporção da caseína)

Grupo 8

Dieta modificada SEM CASEÍNA + gavagem de 0,5ml de *E. coli* O157:H7 em concentração de 7×10^{10} UFC/ml + "WPC" (mesma proporção da caseína)

3.8 Enumeração e detecção da *E. coli* O157:H7

A avaliação da presença da *E. coli* O157:H7 foi feita pela determinação de sua quantidade, pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) a partir do plaqueamento das diluições seriadas das fezes dos camundongos. As coletas foram realizadas nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 (Nagano et al., 2003).

3.9 Contagem bacteriana em amostras de fezes

Foram coletados amostras de 1 grama de fezes que foram diluídas de forma decimal e seriada em 9ml de PBS (phosphate-buffered solution) 0,1M (pH 7,4), estéril e um volume de 0,1ml (100 microlitros) das mesmas (10^{-6} , 10^{-7}) foi semeada em Ágar MacConkey (MCC) para contagem de enterobactérias e Ágar MacConkey sorbitol (SORB) (March et al., 1986), para contagem específica (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.). As placas foram incubadas por 24h a 37°C.

3.10 Prova do látex

À partir do Ágar MacConkey Sorbitol (SORB), da diluição 10^{-7} , cinco colônias claras (sorbitol negativo), foram coletadas para teste de látex com soro anti *E. coli* O157 EHEC (Newprov, U.S.A.) (Bach et al., 2005).

O objetivo foi observar a possível presença de colônias pequenas, arredondadas, lisas e claras (não fermentadoras do sorbitol) no ágar SORB. No teste com anti-soro, as colônias foram misturadas em uma gota de solução salina em uma lâmina ou cartão com anti-soro O157 (Garcia, 2006). Observou-se a presença ou ausência de aglutinação. Resultados, falso-positivos e falso-negativos, foram descartados utilizando-se os controles positivos e negativos presentes no kit para teste.

3.11 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados, no 8º dia experimental, seguindo as recomendações

da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 04/97 (Utilização..., 1997). Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical (hipoxia), de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e autorizado pelo CETEA/UFMG.

3.12 Segmentos intestinais e histopatologia

Para verificar possíveis alterações, causadas pela *E. coli* O157:H7 na mucosa intestinal dos camundongos, segmentos tais como jejuno proximal, jejuno distal, íleo e cólon (Dean Nystron et al., 2003; Nagano et al., 2003) foram retirados no 8º dia de inoculação.

O tratamento dado aos tecidos foi semelhante em todos os grupos experimentais. Todos os intestinos foram retirados e lavados em solução de PBS. As porções intestinais foram fixadas em formol, a 10%, tamponado. Os intestinos já fixados foram enrolados da porção proximal para distal, formando um “rocambolé” e depois recortados transversalmente, de modo a obter um fragmento contendo toda a extensão intestinal da porção proximal (interna), até a porção distal (externa). Este fragmento foi processado conforme rotina para inclusão em parafina de modo a se obter cortes histológicos de 5 µm consecutivos, a partir da superfície de inclusão, utilizando-se um micrótomo Spencer (American Optical). As lâminas foram numeradas em série e coradas em hematoxilina e eosina (HE). Este material foi então codificado, examinado e submetido à análise histopatológica e morfométrica.

Os cortes foram selecionados a partir da observação em microscópio óptico Zeiss acoplado a um vídeo-câmera, sendo as imagens capturadas utilizando-se um computador. O programa analisador de imagens Image-Pro® Plus (Media Cybernetics, MD, EUA) foi utilizado para obtenção das medidas.

Também foram retirados o baço, o fígado e os rins para coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica (Nagano et al., 2003).

3.13 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 3.0.3® (San Diego CA). Recorreram-se à análise estatística descritiva utilizando-se a média, desvio padrão e o coeficiente de variação para tabular os dados de consumo das dietas e ganho de peso. Para a enumeração de *E. coli* O157: H7 os dados da contagem foram convertidos para \log_{10} (Azevedo, 1998 e Bach et al., 2005). Para comparar todos os dados, inclusive os referentes à altura das vilosidades intestinais, entre os grupos controle e os desafiados com a bactéria foi utilizada a técnica de pareamento através de Teste t-Student. Para avaliar todos os grupos entre si utilizou-se o teste ANOVA ONE WAY com análise de variância e teste

de comparação múltipla, segundo Tukey (Bach et al., 2005; Wolber et al., 2005). Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$ (Sampaio, 2002; Wolber et al., 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo de dietas

O consumo das dietas padrão e modificadas (Tab. 2) foi mensurado através da subtração da quantidade ofertada pela quantidade que sobrou na parte superior das gaiolas (Gagnon et al., 2006). Os resultados, mesmo apresentando um desvio padrão alto, apresentaram um coeficiente de variação (CV) de até 30%, respeitando-se a variação de 20 a 30% para respostas animais (Sampaio, 2002).

Tabela 2 - Consumo das diferentes dietas, durante os sete dias experimentais, dos grupos controle (gavagem com salina) e desafiados com *E. coli* O157: H7.

CONSUMO DAS DIETAS EM GRAMAS				
	AIN 93	ALFA	BETA	WPC
GRUPOS SEM DESAFIO				
Média	29,10	19,23	21,15	19,07
Desvio padrão	4,64	1,71	2,79	3,18
Coeficiente de Variação	15,94	8,89	13,19	16,67
GRUPOS DESAFIADOS				
Média	19,48	15,42	16,04	9,36
Desvio padrão	5,60	5,29	0,82	1,58
Coeficiente de Variação	22,63	28,59	30,16	18,23

O desvio padrão alterado se justifica porque as medições foram realizadas em um curto período e a ingestão dietética variou muito entre os grupos (o que dificultou a “diluição do erro”), diferentemente de Gagnon et al. (2006) que encontraram um menor desvio padrão ao fazerem as medições durante 14 dias (sete dias antes e sete dias após o desafio com a bactéria). Neste trabalho, isso não foi possível porque as medições foram feitas no dia zero e até sete dias após o desafio. A detecção da EHEC no intestino

delgado se mostrou entre o 3^o e o 6^o dia após o desafio. Após este período, a contagem de UFC nas fezes diminuiu progressivamente estando de acordo com o trabalho de Nagano et al. (2003).

Todos os grupos iniciaram o experimento com 200 gramas de dieta padrão e modificada. Esta dieta foi mantida em congelador a -20°C , sendo descongelada aos poucos e diariamente para que conservasse suas propriedades nutricionais.

O resultado foi expresso como média de ingestão de cada grupo ao final do experimento.

A comparação entre consumo de dietas dos diferentes grupos está representada nas Fig. 2, 3 e 4. Quando confrontados os dados entre os grupos controle (gavagem com salina) e os grupos desafiados com a bactéria, verificam-se diferenças estatisticamente significativas na ingestão dietética ($p < 0,05$). Estas diferenças estão

principalmente entre os grupos AIN-93 salina (ingestão total de 174,65g e média de 29,1g) e o grupo AIN-93 *E. coli* (ingestão total de 116,89g e média 19,48g) (Fig. 2). O mesmo foi observado entre os grupos Beta salina (ingestão total de 126,94g e média 21,15g) e Beta *E. coli* (ingestão total de 80,23g e média 16,04g) (Fig. 3) e entre "WPC" salina (ingestão total 114,43g e média 19,07g) e o grupo "WPC" *E. coli* (ingestão total 56,21 g e média 9,36 g) (Fig. 4).

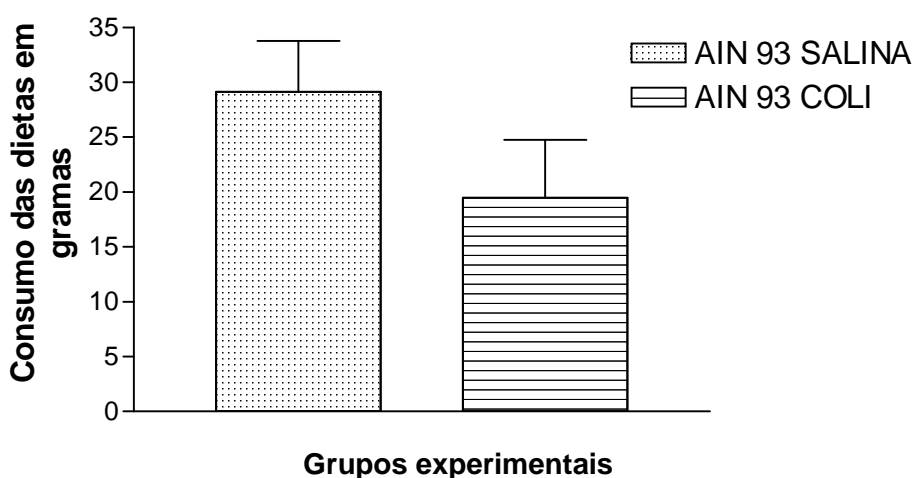


Figura 2 – Consumo das diferentes dietas por sete dias entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria ($p < 0,0001$)

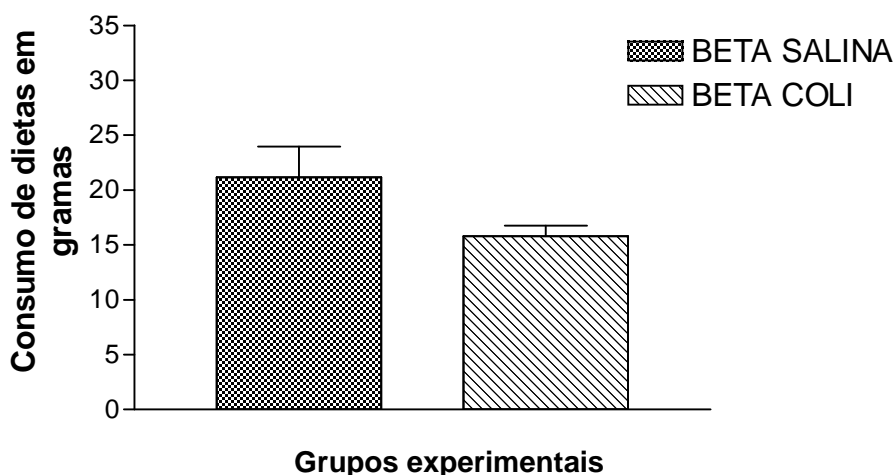
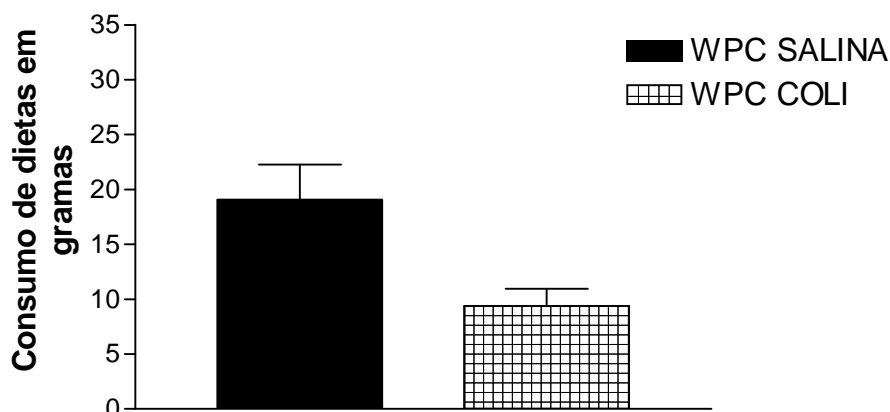


Figura 3 – Consumo das diferentes dietas por sete dias entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria ($p = 0,0081$)



Grupos experimentais

Figura 4 – Consumo das diferentes dietas por sete dias entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria ($p=0,0015$)

A diminuição na ingestão pode ser explicada porque os camundongos infectados com a EHEC *E. coli* O157:H7 apresentaram um quadro de anorexia entre o segundo e o terceiro dia de infecção. Esta manifestação clínica é a mais freqüente, segundo Taguchi et al. (2002), afetando cerca de 70% dos indivíduos acometidos por doenças inflamatórias intestinais.

Não foi observada diferença significativa no consumo das dietas entre os grupos alfa salina e alfa *E. coli*.

4.2 Ganho de Peso

Os camundongos iniciaram o experimento com uma faixa de peso entre oito e treze gramas. O peso corporal foi monitorado nos dias: zero, um, três, cinco e sete e expressado com os valores da média de cada grupo (Tab. 3) ao final do experimento.

Tabela 3 - Ganho de peso, durante os sete dias experimentais, dos grupos controle(gavagem com salina) e desafiados com *E. coli* O157: H7.

	GANHO DE PESO EM GRAMAS			
	AIN 93	ALFA	BETA	WPC
GRUPOS SEM DESAFIO				
Média	11,82	10,61	10,46	11,52
Desvio padrão	2,42	2,01	1,77	2
Coeficiente de Variação	20,4	18,9	16,9	17,3
GRUPOS DESAFIADOS				
Média	12,28	11,44	11,92	11,09
Desvio padrão	1,66	1,5	1,62	1,37
Coeficiente de Variação	13,5	13,1	13,5	12,8

Da mesma forma que na ingestão dietética, o desvio padrão do ganho de peso também se apresentou alterado, mas o coeficiente de variação foi dentro do esperado.

Trabalhos de Nagano et al. (2003) e Gamage et al. (2006) usaram animais experimentais na faixa etária de quatro a seis semanas. Já Low et al. (2003) utilizaram camundongos Balb/C de até sete semanas. O peso aproximado destes, segundo a idade, era entre 18 e 22 gramas. Neste trabalho, verificou-se que camundongos com esta faixa de peso eram mais resistentes à enterite causada pela *E. coli* O157: H7. Esta resistência pode ser devido à maturidade dos sistemas orgânicos de defesa contra patógenos, especialmente durante o estresse pela infecção. A ação deste sistema pode reverter parcialmente a atrofia da mucosa, apesar do mecanismo não ser inteiramente conhecido, atuando em vários níveis de modulação de respostas imunológicas ou influenciando sobre a oxigenação e suprimento sanguíneo para a mucosa intestinal (Mahan, 2002).

Foram utilizados, portanto, animais mais jovens na faixa de peso entre oito e treze gramas.

Os grupos que receberam gavagem com salina apresentaram uma média de ganho de peso menor do que os grupos desafiados, isto é justificado porque os lotes iniciais de animais para o experimento

apresentaram um peso menor. Quando o terceiro lote foi iniciado, casualmente, os animais com um peso maior pertenceram ao grupo desafiado com a bactéria. Estatisticamente, não houve diferença no ganho de peso entre os grupos controle e desafiados.

4.3 Contagem de UFC e enumeração de *E. coli* O157: H7

Os resultados das contagens de UFC/grama, que foi realizada nas placas de diluição 10^{-6} das amostras de fezes de todos os grupos experimentais, encontram-se nas tabelas 4, 5, 6 e 7. Foi utilizado ágar MacConkey (MCC) para observar a presença de enterobactérias e ágar MacConkey Sorbitol (SORB) específico para a enumeração de *E. coli* O157: H7. Todas as contagens do primeiro incluíram as bactérias existentes na microbiota intestinal dos camundongos antes e após o desafio com *E. coli* O157: H7. Já no ágar SORB comparou-se a contagem, principalmente, após o desafio porque todos os grupos passaram pelo teste de triagem e não apresentavam colônias sorbitol negativas no dia zero. Os resultados foram expressos em valores absolutos (Tab. 4 e 6) para facilitar a visualização da flutuação da contagem de UFC durante o tempo experimental. Por outro lado, para fazer as comparações, pelo pareamento pelo teste t-Student, os dados foram lançados na forma de log UFC/grama de fezes (Tab. 5 e 7).

Tabela 4 - Contagem total de enterobactérias por UFC/grama de fezes, realizada em ágar mcConkey (MCC) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, dos grupos dos camundongos sem desafio (gavagem com salina) e desafiados com *E. coli* O157: H7.

Grupos/ Dias	ÁGAR mcConkey (ENTEROBACTÉRIAS)*				
	0	1	3	5	7
AIN93 Salina	1×10^7	1×10^7	$5,71 \times 10^9$	$3,90 \times 10^9$	$5,15 \times 10^9$
ALFA Salina	1×10^7	$2,16 \times 10^7$	$4,26 \times 10^9$	$3,32 \times 10^9$	$5,20 \times 10^9$
BETA Salina	1×10^7	1×10^7	$1,74 \times 10^9$	$8,43 \times 10^9$	$3,66 \times 10^9$
WPC Salina	1×10^7	1×10^7	$3,09 \times 10^9$	9×10^9	$5,63 \times 10^9$
Grupos/ Dias	0	1	3	5	7
AIN93 coli	1×10^7	1×10^7	$2,67 \times 10^9$	$3,05 \times 10^9$	$5,01 \times 10^8$
ALFA coli	1×10^7	$4,36 \times 10^8$	$8,03 \times 10^9$	$2,35 \times 10^9$	$2,46 \times 10^9$
BETA coli	1×10^7	1×10^9	$4,29 \times 10^9$	$4,77 \times 10^9$	$5,70 \times 10^9$
WPC coli	1×10^7	1×10^7	$3,98 \times 10^9$	$1,97 \times 10^9$	$5,20 \times 10^9$

* Resultados expressos em valores absolutos.

Tabela 5 - Resultados da contagem total de enterobactérias, expressos em log UFC/grama de fezes, realizada em ágar mcConkey (MCC) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, dos grupos dos camundongos sem desafio (gavagem com salina) e desafiados com *E. coli* O157: H7.

ÁGAR mcConkey (ENTEROBACTÉRIAS)*					
Dias Experimentais	0	1	3	5	7
Grupos SALINA					
AIN 93 Salina					
Média	0	0	0,66	0,42	0,66
Desvio Padrão	0	0	0,31	0,40	0,23
Grupo					
Alfa Salina					
Média	0	0,15	0,54	0,39	0,59
Desvio Padrão	0	0,36	0,30	0,35	0,38
Grupo					
Beta Salina					
Média	0	0	0,18	0,92	0,44
Desvio Padrão	0	0	0,22	0,08	0,35
Grupo					
"WPC" Salina					
Média	0	0	0,42	0,95	0,70
Desvio Padrão	0	0	0,26	0	0,22
<hr/>					
Dias Experimentais	0	1	3	5	7
Grupos <i>E. coli</i>					
AIN93 coli					
Média	0	0	0,37	0,41	0,54
Desvio Padrão	0	0	0,24	0,27	0,44
Grupo					
Alfa coli					
Média	0	0,45	0,86	0,25	0,27
Desvio Padrão	0	0,28	0,22	0,33	0,30
Grupo					
Beta coli					
Média	0	0,36	0,50	0,60	0,64
Desvio Padrão	0	0,37	0,39	0,32	0,38
Grupo					
"WPC" coli					
Média	0	0	0,56	0,24	0,64
Desvio Padrão	0	0	0,20	0,23	0,33

Teste t-Student ($p < 0,05$).

De acordo com a análise estatística pelo teste t-Student pareado, observou-se, no ágar MCC (enterobactérias), diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem de UFC/grama de fezes no dia 3, entre os grupos que receberam as dietas: AIN93 salina ($5,71 \times 10^9$) e AIN93 coli ($2,67 \times 10^9$). No mesmo dia, houve diferença na contagem entre os grupos ALFA salina ($4,26 \times 10^9$) e ALFA coli ($8,03 \times 10^9$).

Já entre os grupos de dieta “WPC” salina (9×10^9) e “WPC” coli ($1,97 \times 10^9$) houve diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de UFC/grama de fezes no dia 5.

A contagem de UFC/grama de fezes maior nos grupos desafiados em relação aos grupos controle sugere que a bactéria inoculada, no dia zero, conseguiu se estabelecer junto a microbiota intestinal dos camundongos. Os grupos foram inoculados com 7×10^{10} UFC/ml no dia zero e a bactéria começou a ser recuperada nas fezes a partir do dia experimental 3.

Também foi observada uma contagem de UFC/grama de fezes inferior nos grupos desafiados em relação aos grupos controle. Segundo Nagano et al. (2003), esta diminuição da contagem de UFC/grama de fezes das bactérias, observada nos grupos desafiados em relação aos grupos controle, pode ser devido à indução da resposta imune intestinal ao patógeno, posto que não foi observada diferença significativa nas contagens total de bactérias por grama de fezes no ágar MCC, entre os outros grupos experimentais.

No ágar sorbitol (SORB) específico foi realizada a enumeração da *E. coli* O157:H7, segundo as recomendações de March et al. (1986) com objetivo de contar apenas aquelas colônias de cor clara que não fermentaram o sorbitol. Os resultados também foram expressos em valores absolutos para facilitar a visualização da flutuação da contagem de UFC durante o tempo experimental (Tab. 6). Para comparar os dados, pelo pareamento pelo teste t-Student, os mesmos foram transformados na forma de log UFC/grama de fezes (Tab. 7).

Tabela 6 – Contagem de *E. coli* O157:H7 em ágar sorbitol (SORB) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, a partir das fezes dos camundongos, dos grupos controle(gavagem com salina) e desafiados com *E. coli* O157: H7.

ÁGAR SORBITOL (ESPECÍFICO)*					
Grupos/ Dias	0	1	3	5	7
AIN93 Salina	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7
ALFA Salina	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7
BETA Salina	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7
WPC Salina	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7	1×10^7
Grupos/ Dias	0	1	3	5	7
AIN93 coli	1×10^7	1×10^7	$2,77 \times 10^8$	$3,38 \times 10^9$	$4,4 \times 10^8$
ALFA coli	1×10^7	1×10^8	$6,02 \times 10^9$	$3,18 \times 10^8$	$3,64 \times 10^9$
BETA coli	1×10^7	1×10^8	$3,52 \times 10^9$	$1,03 \times 10^8$	$2,83 \times 10^7$
WPC coli	1×10^7	1×10^7	$4,11 \times 10^9$	$4,21 \times 10^9$	$3,03 \times 10^8$

*Resultados expressos em valores absolutos.

Tabela 7 - Resultados expressos em log UFC/grama de fezes de *E. coli* O157:H7 em ágar sorbitol (SORB) nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, dos grupos dos camundongos controle (gavagem com salina) e desafiados.

Dias Experimentais	ÁGAR SORBITOL (ESPECÍFICO)*				
	0	1	3	5	7
Grupos SALINA					
AIN93 salina					
Média	0	0	0	0	0
Desvio Padrão	0	0	0	0	0
Grupo					
Alfa Salina					
Média	0	0	0	0	0
Desvio Padrão	0	0	0	0	0
Grupo					
Beta Salina					
Média	0	0	0	0	0
Desvio Padrão	0	0	0	0	0
Grupo					
"WPC" Salina					
Média	0	0	0	0	0
Desvio Padrão	0	0	0	0	0
Dias Experimentais	0	1	3	5	7
Grupos COLI					
AIN93 coli					
Média	0	0	0,36	0,43	0,50
Desvio Padrão	0	0	0,29	0,33	0,42
Grupo					
Alfa coli					
Média	0	0,24	0,67	0,34	0,42
Desvio Padrão	0	0,33	0,37	0,40	0,36
Grupo					
Beta coli					
Média	0	0,35	0,40	0,01	0,27
Desvio Padrão	0	0,40	0,37	0,03	0,41
Grupo					
"WPC" coli					
Média	0	0	0,57	0,46	0,43
Desvio Padrão	0	0	0,20	0,40	0,22

Teste t-Student ($p < 0,05$).

Observou-se, no dia três, que todos os grupos desafiados apresentaram contagem de UFC/grama de fezes maior do que aqueles grupos não desafiados. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos AIN 93 salina (1×10^7) e o grupo AIN93 coli ($2,77 \times 10^8$); o grupo alfa salina (1×10^7) e o grupo alfa coli ($6,02 \times 10^9$); o grupo beta salina (1×10^7) e o grupo beta coli ($3,52 \times 10^9$); e o grupo "WPC" salina (1×10^7) e "WPC" coli ($4,11 \times 10^9$).

No dia cinco, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos AIN 93 salina (1×10^7) e o grupo AIN93 coli ($3,38 \times 10^9$); o grupo alfa salina (1×10^7) e o grupo alfa coli ($3,18 \times 10^9$). O mesmo foi visto entre os grupos "WPC" salina (1×10^7) e "WPC" coli ($4,21 \times 10^9$).

No dia sete, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos AIN 93 salina (1×10^7) e o grupo AIN93 coli ($4,4 \times 10^8$); o grupo alfa salina (1×10^7) e o grupo alfa coli ($3,64 \times 10^9$). Também houve diferença entre os grupos "WPC" salina (1×10^7) e "WPC" coli ($3,03 \times 10^8$).

Estes resultados se justificam porque os camundongos, antes de serem inoculados,

passaram por uma triagem que excluiu a possibilidade da presença de outras bactérias sorbitol negativas que poderiam induzir a uma leitura falso-positiva. Como todos os grupos iniciaram o experimento sem colônias sorbitol negativo, os valores de contagem de UFC/grama de fezes nos dias após o desafio foram quase todos significativos e diferentes estatisticamente.

Taguchi et al. (2002) encontraram uma contagem entre 10^8 e 10^9 UFC/g de fezes no 5º dia após o desafio. Gagnon et al. (2006) encontraram em seus estudos, uma média de contagem de 10^7 UFC/g nas fezes dos grupos infectados 24 horas após a infecção. No presente estudo, também foram encontrados valores de concentração próximos a esta referência no mesmo período e que, já se apresentou superior no terceiro dia experimental.

4.4 Prova do Látex

A prova do látex apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 99%. Os resultados das provas de látex, realizadas com as colônias de *E. coli* sorbitol negativas, a partir das fezes dos camundongos, encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados das provas de látex realizadas com as colônias de *E. coli* sorbitol negativas das placas de ágar sorbitol na diluição 10^{-7} coletadas após o desafio com o sorotipo O157: H7.

Grupos/ Dias	COLÔNIAS SORBITOL NEGATIVAS				
	0	1	3	5	7
AIN93 coli	0	5	5	5	5
ALFA coli	0	5	5	5	5
BETA coli	0	3	5	5	5
WPC coli	0	5	5	5	5

Cinco colônias claras (sorbitol negativo) foram submetidas ao teste de látex com soro anti *E. coli* O157 EHEC segundo as recomendações de Bach et al. (2005). No dia experimental 1, das cinco colônias coletadas do grupo Beta coli, duas foram

negativas (não formaram aglutinação) na prova do látex.

A confirmação com anti-soro O157 e H7 foi necessária, uma vez que outras *E. coli* podem apresentar antígeno O157 e o soro anti-O157 freqüentemente possui reação

cruzada com *Citrobacter freundii*, *Escherichia hermannii* e outras bactérias. Segundo Nagano et al. (2003), para assegurar que a técnica de soroaglutinação seja efetiva, pode-se fazer uma suplementação no meio de cultura a ser utilizado. Já (Dean Nystron et al. (2003) mostraram a administração de antimicrobianos, por via oral, para diminuir a carga da microbiota intestinal pré-existente no animal experimental, facilitando a implantação do microrganismo a ser testado.

Neste experimento, os animais receberam no dia -1, água com estreptomicina (5g/litro) durante as 24 horas antes da gavagem com a bactéria, conforme recomendado por Dean Nystron et al. (2003). Isto fez com que a microbiota pré-existente diminuísse (o que foi constatado na contagem de UFC/grama de fezes do dia experimental zero) favorecendo a instalação e fixação da *E. coli* O157:H7 na mucosa intestinal dos animais testados.

4.5 Alterações clínicas e fisiológicas

Os animais experimentais desafiados com a *E. coli* O157:H7 não apresentaram evacuação aquosa (diarréia) ou com sangue, o que também foi observado por Nagano et al. (2003). Observou-se apenas que alguns animais do grupo alfa-lactalbumina desafiados com a *E. coli* (grupo alfa *E. coli*) apresentaram fraqueza nas pernas posteriores e dificuldade de locomoção. Estes animais também apresentaram uma contagem de UFC/g de fezes no ágar sorbitol maior no dia 7 após o desafio (apresentado anteriormente na tabela 6).

Cerca de 20 a 30% dos pacientes infectados pela *E. coli* O157:H7 podem apresentar encefalopatia, que é uma complicação que afeta o sistema nervoso central, sendo grande determinante de mortalidade na fase aguda da infecção. Segundo Taguchi et al. (2002), os camundongos infectados experimentalmente com EHEC desenvolveram sintomas neurológicos e sistêmicos. Os sintomas neurológicos foram

confirmados por encefalopatia apresentada nas análises histopatológicas porque as toxinas produzidas pela bactéria inibem a síntese protéica das células eucarióticas, incluindo as células endoteliais do cérebro. Mais especificamente as toxinas tipo shiga II também são tóxicas aos neurônios do sistema nervoso central causando encefalopatia fatal aguda. Neste estudo, apesar de não ter sido feita a avaliação histopatológica de cérebro, pode-se apenas deduzir, ou suspeitar, que os distúrbios apresentados parecem ser causados por algum tipo de encefalopatia.

Dentre os grupos desafiados com a *E. coli* O157:H7 os animais apresentaram letargia e pêlos eriçados (Anexo IV) após o 3º dia experimental.

4.6 Alterações histopatológicas e morfológicas

O pré-tratamento com estreptomicina foi essencial para a colonização bacteriana, indicando que a microbiota intestinal normal existente no animal tem uma função crítica de proteção à infecção pela *E. coli* O157:H7, o que também foi observado por Funatogawa et al. (2002). Após a inoculação intragástrica da *E. coli*, observou-se, dentre os segmentos intestinais avaliados tais como jejuno proximal, jejuno distal, íleo e cólon algumas alterações mais aparentes nas alturas das vilosidades (Fig. 6, 7 e 8) nas porções dos jejunos distais (Anexo III) e íleos (Anexo V).

A bactéria, por ser ácido resistente, passa através do estômago para se fixar na região mais distal do intestino delgado, onde ocorre a penetração ou entrada de toxinas (Dean Nystron et al., 2003). Neste local, as placas de Peyer são mais comuns e a motilidade intestinal é reduzida pela válvula íleo-cecal, propiciando a bactéria mais tempo para colonizar e causar danos (Phillips et al., 2000).

Fez-se a comparação entre os grupos controle e desafiados através da análise de pareamento pelo teste t-Student e pelo teste de comparação múltipla, segundo Tukey.

Foram avaliados separadamente as porções intestinais dos jejunos distais e íleos.

Comparando-se, pelo pareamento, os cortes histológicos e as alturas das vilosidades dos jejunos distais pela morfometria, entre os grupos controle e desafiados, não foram evidenciadas diferenças significativas. Entretanto ao avaliar, pela comparação múltipla, qual das proteínas do soro de leite tem maior efeito protetor sobre as vilosidades intestinais dos camundongos

desafiados, em relação ao padrão AIN93, observou-se que a fração alfa-lactalbumina teve um efeito melhor de proteção (Fig.5). O tamanho das vilosidades dos jejunos distais deste grupo foi maior em comparação às outras proteínas testadas e também em relação ao padrão AIN93. Os outros grupos desafiados apresentaram vilosidades de jejunos distais irregulares e menores mas não diferentes significativamente comparados aos grupos controle (Gagnon et al., 2006).

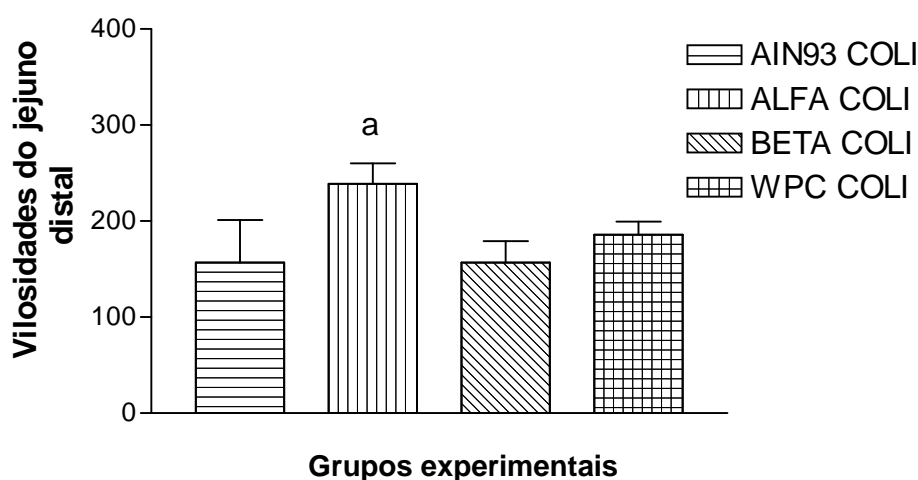


Figura 5 – Altura das vilosidades intestinais dos jejunos distais, pela morfometria, após os sete dias experimentais, avaliados nos grupos desafiados com a bactéria ($p=0,00$).

Avaliando os cortes histológicos dos íleos, pelo pareamento, detectou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) apenas entre os grupos, AIN93 salina e AIN93 coli (Fig. 6). Os outros grupos, avaliados também por pareamento, não apresentaram diferenças significativas nas alturas das vilosidades desta porção.

Neste caso observou-se que o grupo AIN93coli apresentou maiores danos na altura das vilosidades ileais, em comparação com o seu o grupo sadio AIN93 salina. Os outros grupos, também avaliados por pareamento, não apresentaram diferenças significativas.

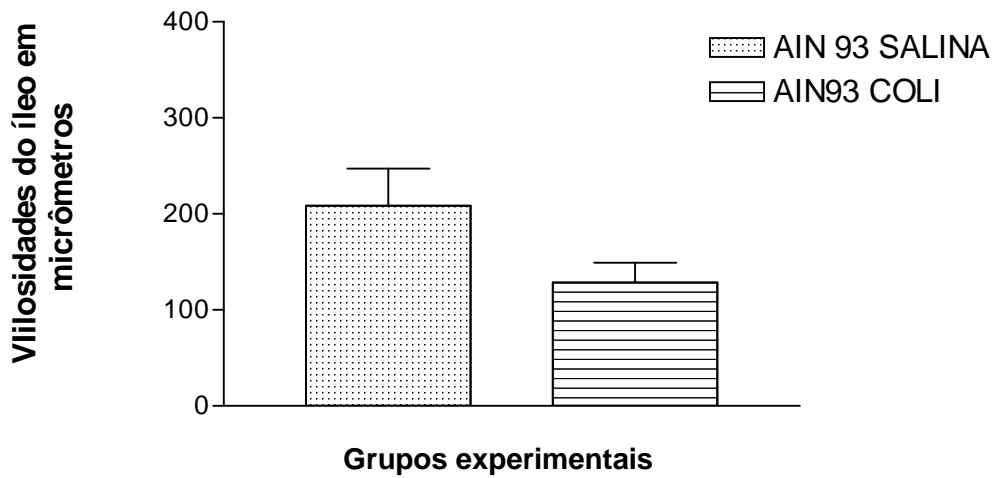


Figura 6 – Altura das vilosidades intestinais dos íleos, pela morfometria, após os sete dias, avaliados entre os grupos controle (gavagem com salina) e os desafiados com a bactéria ($p=0,02$)

A avaliação dos cortes histológicos dos íleos dos grupos desafiados também foi realizada, pela comparação múltipla, para saber qual das proteínas teve maior efeito protetor das vilosidades ileais em relação ao grupo AIN93 padrão. Detectou-se uma diferença estatisticamente significativa

($p<0,05$) no grupo Beta coli em relação ao grupo AIN93 coli. (Fig. 7). O grupo Beta coli não só apresentou um efeito protetor maior nas vilosidades dos íleos, em relação as outras proteínas, como superou até mesmo o grupo AIN93 coli.

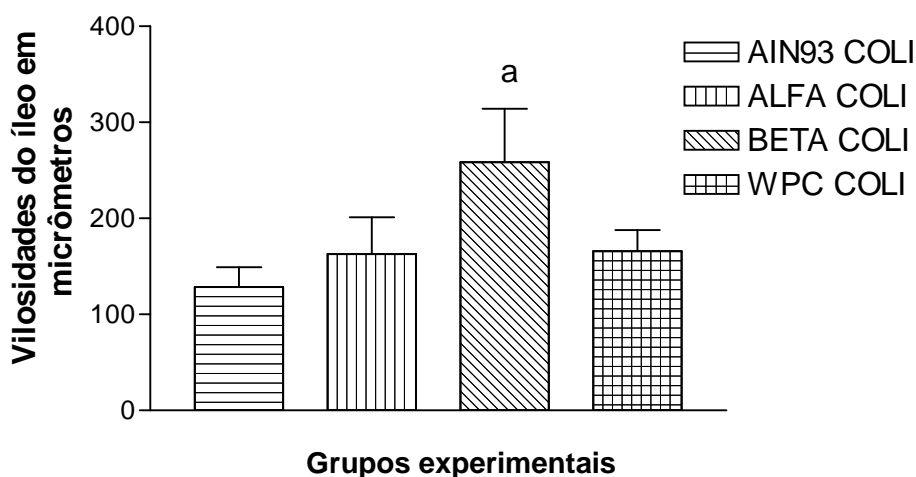


Figura 7 – Altura das vilosidades intestinais dos íleos, pela morfometria, após os sete dias, avaliados nos grupos desafiados com a bactéria ($p=0,00$).

O achatamento ou desaparecimento das vilosidades pode ser resultante da despolimerização da actina desencadeada pela bactéria aderente. Embora algumas proteínas encontradas no pedestal não sejam derivadas da microvilosidade, há indícios de que existe um processo mais complexo do que uma simples reconstrução da microvilosidade abaixo da bactéria aderente. Atualmente, isto ainda não está claro, até que todas as proteínas essenciais formadoras de pedestal sejam identificadas (Vallance e Finlay, 2000).

Segundo Nagano et al. (2003), uma nutrição protéico-calórica inadequada pode aumentar a susceptibilidade a EHEC O157:H7 em camundongos. Baseado na imunomodulação, a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina e seus peptídeos associados fornecem uma alta proporção de cisteína, que é requerida para a síntese de proteínas envolvidas nas respostas de fase aguda. O conteúdo de cisteína, utilizada na síntese da glutatona, em combinação com lisozima, outro elemento que pode ser isolado do soro de leite, promove uma integração de fatores aparentemente sinérgicos que protegem contra organismos virais e bacterianos. Além disso, tais proteínas são ricas em aminoácidos sulfurados sendo utilizadas como suplemento protéico em dietas para melhoria do sistema imune agindo, principalmente no sistema GALT (Low et al., 2003).

As interações entre os elementos do leite e a bactéria ocorrem, prevenindo as lesões da bactéria nas células epiteliais (Araújo e Giugliano, 2001) melhorando o mecanismo de defesa inata do hospedeiro às infecções (Afuwape et al., 2004).

Não foram evidenciados danos causados pela *E. coli* O157:H7 em órgãos como o baço, o fígado e os rins.

5. CONCLUSÕES

As frações protéicas do soro, alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina exercem efeito protetor sobre as vilosidades intestinais em camundongos Balb/C infectados por *E. coli* O157:H7.

A fração alfa tem melhor efeito protetor das vilosidades da porção jejuno distal e a fração beta tem melhor efeito na porção ileal.

O concentrado protéico de soro "WPC" não demonstrou efeito protetor sobre as vilosidades intestinais.

O soro do leite apresenta grande potencial para o controle de infecções intestinais causadas por *E. coli* O157:H7.

Para estudos sobre a infectividade de *E. coli* O157:H7 pode-se utilizar camundongos apresentando microbiota intestinal normal, sem que isto prejudique as análises sobre a mesma.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFUWAPE, A. O., TURNER, M. W.; STROBEL, S. Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin. and Exp. Immunol.*, v. 136, n. 1, p. 40-48, 2004.

ARAÚJO, A. N., GIUGLIANO, L.G. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *E. coli* O157:H7 to HeLa cells. *BMC Microbiol.*, v.1, n.25, 1421-2180, 2001.

AZEVEDO, C. *Características físico-químicas, contagem de microrganismos típicos e teor de acetaldeído na avaliação da qualidade do iogurte*. 1998. 58 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- BACH, S. J., STANFORD K., MCALLISTER, T. A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in feces from corn- and barley-fed steers. *Federation of European Microbiological Societies- FEMS Microbio Let.* v. 252, n. 1, p. 25–33, 2005.
- BALLIN, N. Z. Estimation of whey protein in casein coprecipitate and milk powder by high-performance liquid chromatography quantification of cysteine. *J. Ag. F. Chem.*, v. 54, n.1 , p. 4131- 4135, 2006.
- BELOBRAJDIC, D. P., MCINTOSH, G. H., OWENS, J. A. Whey proteins protect more than red meat against azoxymethane induced ACF in wistar rats. *Canc. Let.*, v. 198, n.1, p. 43-51, 2003.
- BIDET, P., MARIANI-KURKDJIAN, P., GRIMONT, F., BRAHIMI, N., COURROUX, C., GRIMONT, P., BINGEN, E. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J. Méd. Microbiol.*, v. 54, n. 1, p. 71-75, 2005.
- BOAGLIO, A.; BASSANI, G.; PICÓ, G.; NERLI, B. Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. *J. Chromat. B*, v. 837, n. 1-2, p. 18–23, 2006.
- BOUVET, J.; VERNOSY-ROZAND, C. Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxiques (VTEC) et *Escherichia coli* O157: H7 dans les aliments. *Ver. Med. Vet.*, v. 10, n. 151, p. 907-914, 2000.
- CAMARGO, D. S.; ALVES, G.; GARCIA, S.; MIZUBUTI, I. Y. Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja. *Semina: C. Agra.*, v.21, n.1, p.45-51, 2000.
- CEPONIS, P. J. M., RIFF, J. D.; SHERMAN, P. M. Epithelial cell signaling responses to enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 10, n. 1, p. 199-203, 2005.
- CURRIE, C. G.; McCALLUM, K.; POXTON, I. R. Mucosal and systemic antibody responses to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7 in health and disease. *J. Med. Microbiol.*, v.50, p. 345-354, 2001.
- DEAN-NYSTROM, E. A.; BOSWORTH, B. T.; CRAY, W. C.; MOON, H. W. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.*, v. 65, n. 5, p. 1842-1848, 1997.
- DEAN-NYSTROM, E. A.; MELTON-CELSA, A .R.; POHLENZ, J. F. L.; MOON, H. W. O'BRIEN, A.D. Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 shiga toxin-producing *E. coli* strains in neonatal pigs. *Infect. Immun.*, v.71, n. 11, p. 6526-6533, 2003.
- DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D.; ABE, A.; RUSCHKOWSKI, S.; FINLAY, B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Produces Tir, Which Is Translocated to the Host Cell Membrane but Is Not Tyrosine Phosphorylated. *Infect. Immun.*, v. 67, n. 5, p. 2389–2398, 1999.
- DOENÇAS transmitidas por alimentos. São Paulo; Centro de vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2007. (informe Net DTA) Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Ecolinet.htm>. Acessado em 18/12/2007.
- EMPRESA de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG. Secretaria de Estado da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://www.epamig.br/index.php?Itemid=57&id=193&option=com_content&task=view. Acesso em: 11/01/08.
- FITZHENRY, R. J.; PICKARD, D. J.; HARTLAND, E. L.; REECE, S.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A. D., FRANKEL, G. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. Disponível em: <http://gut.bmjournals.com>. Gut n. 50, p. 180-185, 2002.Acesso em: 11/09/06.

- FONSECA, L. M.; BRADLEY, J. R., Fractionation of whey proteins by complex formation. Patente nº US 6,900,290 B2, Winsconsin Alumni Research Foundation, Madison, WI (US), 31, Maio, páginas 1-24, 2005.
- FUNATOGAWA, K.; IDE, F.; KIRIKAE, F.; SARUTA, K.; NAKANO, M.; KIRIKAE, T.; Use of Immunoglobulin enriched bovine colostrums against oral challenge with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in mice. *Microbiol. Immunol.*, v. 46 n. 11, p. 761-766, 2002.
- GAGNON, M.; KHEADR E. E.; DABOUR, N.; RICHARD, D.; FLISS, I. Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection in Balb/C mice. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 111, p. 26-33, 2006.
- GAMAGE, S. D.; PATTON, A. K.; STRASSER, J. E.; CHALK, C., L.; WEISS, A. A . Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157:H7 persistence and shiga toxin production in the mouse intestine. *Infect. Immun.*, v. 74, n. 3 , p. 1977-1983, 2006.
- GARCIA, P. M. *Detecção de Escherichia coli* O157: H7 em leite por um método convencional e por reação em cadeia da polimerase (PCR). 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J. Nut. Biochem.*, v. 14, n. 5, p. 251-258, 2003.
- KUME, H.; OKASAKI, K.; SASAKI, H. Hepatoprotective effects of whey on D-galactosamine- induced hepatitis and liver fibrosis in rats. *Biosc. Biotech. Biochem.*, v. 70 , n.5, p. 1281-1285, 2006.
- LOW, P.P.L.; RUTHERFURD, K.J.; GILL, H.S.; CROSS, M. L. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized Balb/C mice. *Int. Immunopharmacol.*, v. 1, n 3, p. 393-401, 2003.
- LOW, J. C.; MCKENDRICK, I. J.; MCKECHNIE, C.; FENLON, D.; NAYLOR, S. W.; CURRIE, C.; SMITH, G. E.; ALLISON, L.; GALLY, D. L. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Appl. Environ Microbiol.*, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2005.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10 ed., São Paulo: Roca, 2002. 628 p.
- MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157: H7 associates with hemorrhagic colitis. *J. Clin. microbiol.*, v. 23, n. 5, p. 869-872, 1986.
- MAREK, P.; NAIR, M. K. M.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Survival and growth characteristics of *escherichia coli* O157: H7 in pasteurized and unpasteurized cheddar cheese whey. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 94, n. 1, p. 1 – 7, 2004.
- McKEE, M. L.; MELTON-CELSA, A. R.; MOXLEY, R. A.; FRANCIS, D. H.; O'BRIEN, A. D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to Hep-2 cells. *Inf. Immun.*, v. 63, n. 9, p. 3739-3744, 1995.
- MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. A. A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. *J. Appl. Microbiol.*, v. 89, n. 1, p. 49-55, 2000.
- MIYAMOTO, Y.; LIMURA, M.; KAPER, J. B.; TORRES, A. G.; KAGNOFF, M, F. Role of shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium *in vivo*. *Cell. Microbiol.*, v. 8, n. 5, p. 869-879, 2006.

- NAGANO, K.; TAGUCHI, K.; HARA, T.; YOKOYAMA, S.; KAWADA, K. Adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cecum of mice. *Microbiol. Immunol.*, v. 47, n. 2, p. 125-132, 2003.
- PHILLIPS, A. D.; NAVABPOUR, S.; HICKS, S.; DOUGAN, G.; WALLIS, T.; FRANKEL, G. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. Disponível em: <http://gut.bmjournals.com>. *Gut* n. 47, p. 377-381, 2000. Acesso em: 11/09/06.
- PRODUÇÃO mundial de queijos. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA, 2000-2006. Disponível em: www.leitebrasil.org.br. <http://www.cnpq.embrapa.br/producao/04industrial/tabela04.23.php>. Acesso em: 13/12/07.
- PRUDENCIO, E. S.; BENEDET, H. D. Aproveitamento do soro de queijo na obtenção do extrato hidrossolúvel de soja. *C. Tecnol. Alim.*, v.19, n 1, 1999.
- RAJI, M. A.; MINGA, U.; MACHANGU, R. Current epidemiological status of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Africa. *Chin. Med. J. (Ingl)*, v. 119, n. 3, p. 217-222, 2006.
- REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nut.*, v. 127, n. 5, p. 838-841, 1997.
- REISS, G.; KUNZ, P.; KOIN, D.; KEEFE, E. B. *Escherichia coli* O157:H7 infection nursing homes: review of literature and report of recente outbreak. *J. Amer. Geriat. Soc.* v. 54, n.4, 680-684, 2006.
- SAMPAIO, I. B. M., *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: Fund. Est. Pesq. Méd. Vet. Zoot., 2002. 265 p.
- SANTIAGO, F. E.; THOMAS, S. W.; WINKWORTH, C. L.; RILEY, M. A. Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. *Int. Microbiol.*, v. 8, n.4, p. 271-278, 2005.
- SFEIR, R. M., DUBARRY, M., BOYAKA, P. N., RAUTUREAU, M., TOMÉ, D. The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice. *J. Nut.*, v. 134, n. 2, p. 403-409, 2004.
- SINDAYIKENGERA, S.; WWN-SHUI, W. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from protamex. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* v. 7, n.2, p. 90-98, 2006.
- SOARES, F. M. *Influência do concentrado protéico de soro de leite na qualidade do requeijão em barra com teor reduzido de gordura*. 2002. 36f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TAGUCHI, H.; TAKAHASHI, M.; YAMAGUCHI, H.; OSAKI, T.; KOMATSU, A.; FUJIOKA, Y.; KAMIYA, S. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxicogenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7, strain 6. *J. Med. Microbiol.*, v. 51, n. 4, p. 336-343, 2002.
- TAKAHASHI, M.; TAGUCHI, H.; YAMAGUCHI, H.; OSAKI, T.; KOMATSU, A.; KAMIYA, S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *escherichia coli* O157: H7infection in mice. Federation of European Microbiological Societies- FEMS Microbiol. Let., v. 41, n. 3, 219–226p. 2004.
- TEIXEIRA, L.V. *Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do soro de queijo minas padrão e mussarela produzidos em quatro regiões de Minas Gerais*. 2005. 42 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

UTILIZAÇÃO de animais em projetos de pesquisa. Resolução Normativa 04/97. Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA - GPPG/HCPA , 1997. Disponível em: www.ufrgs.br/bioetica/res497hc.htm. Acesso em: 06/09/06.

VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS). v. 97, p. 8799-8806, 2000.

WELCH, R. A. S.; BURNS, D. J. W.; DAVIS, S. R.; POPAY, A. L.; PROSSER, C. G. Milk Composition, Production and Biotechnology. *Biotech. Agric. Ser.*, n. 18. 1997. 512 p.

WOLBER, F. M.; BROOMFIELD, A. M.; FRAY, L.; CROSS, M. L.; DEY, D. Supplemental dietary whey protein concentrate reduces rotavirus-induced disease symptoms in suckling mice. *J. Nut.*, v. 135, n.6 , p. 1470-1474, 2005.

ANEXOS

Anexo I

Formulação da dieta AIN93G padrão, para crescimento, fases de gestação e lactação de roedores (Reeves, 1997)

Ingredientes	Gramas/Kg de dieta
Amido de milho	529,5
Caseína (≥ 85% de proteína)	200
Sacarose	100
Óleo de soja	70
Fibra(celulose)	50
Mix de minerais*	35
Mix e vitaminas**	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina (41% de colina)	2,5
TBHQ	0,014

Mix de minerais* - carbonato de cálcio, fosfato de potássio monobásico, citrato de potássio, cloreto de sódio, sulfato de potássio, magnésio, citrato férrico e carbonato de zinco.

Mix de vitaminas** - ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, vitaminas A, D, E, K e B-12.

Anexo II

Formulação da dieta modificada com a substituição da caseína pelas proteínas estudadas, seguindo a mesma proporção.

Ingredientes	Gramas/Kg de dieta		
	Alfa-lactalbumina	Beta-lactoglobulina	“WPC”
Amido de milho	529,5	529,5	529,5
Fontes protéicas estudadas	200	200	273*
Sacarose	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70
Fibras (celulose)	50	50	50
Mix de minerais	35	35	35
Mix e vitaminas	10	10	10
L-cistina	3	3	3
Bitartarato de colina (41% de colina)	2,5	2,5	2,5
TBHQ	0,014	0,014	0,014

As fontes protéicas obedeceram p proporção de grau de pureza de ≥ 85%.

As proteínas alfa-lactalbumina e a beta-lactoglobulina já estavam com o grau de pureza adequado.

*Já a quantidade de “WPC” teve que ser ajustada para atingir a mesma concentração.

Anexo III

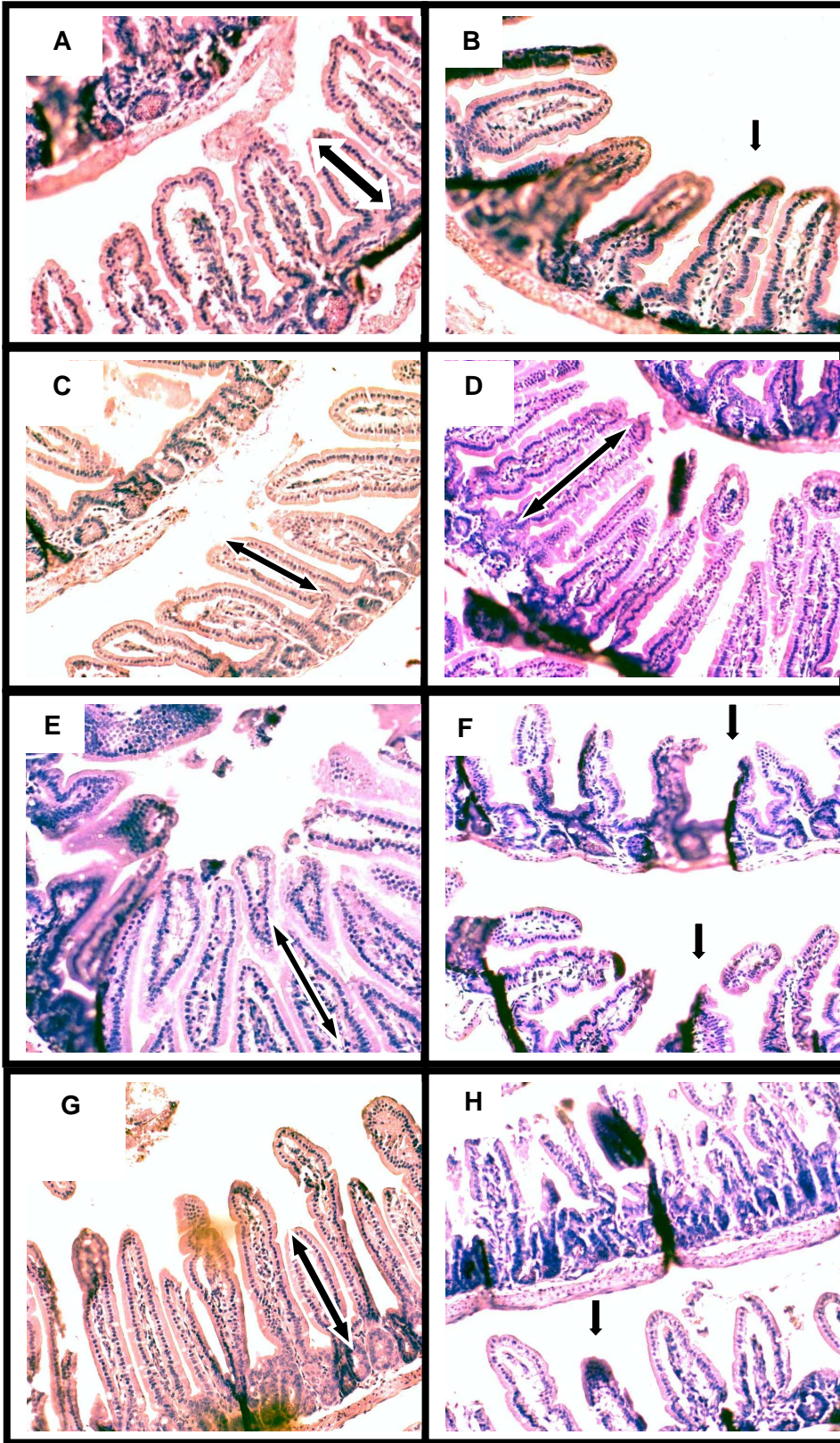
Histopatologia das vilosidades intestinais de jejuno distal dos camundongos sadios (grupo salina) e dos camundongos desafiados (grupo coli) com a *E. coli* O157: H7. Coloração HE.

Legenda

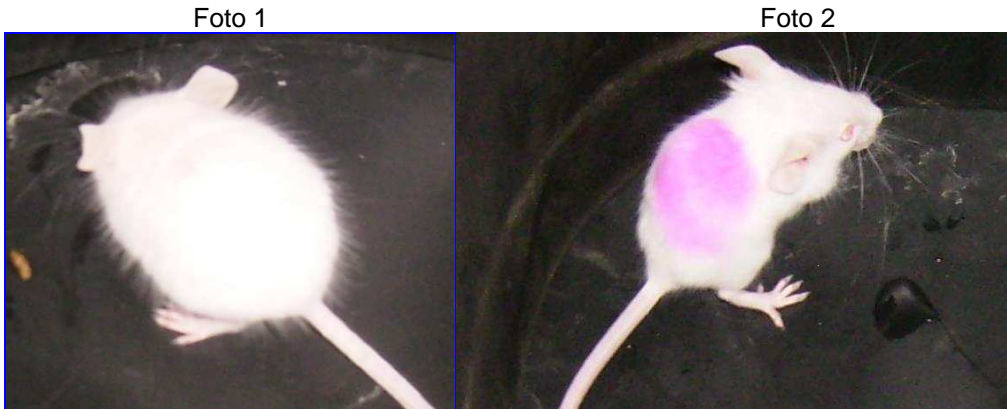
- Figura A – grupo controle AIN93 salina porção jejuno distal (100 X)**
- Figura B – grupo desafiado AIN93 coli porção jejuno distal (100 X)**
- Figura C – grupo controle ALFA salina porção jejuno distal (100 X)**
- Figura D – grupo desafiado ALFA coli porção jejuno distal (100 X)**
- Figura E – grupo controle BETA salina porção jejuno distal (100 X)**
- Figura F – grupo desafiado BETA coli porção jejuno distal (100 X)**
- Figura G – grupo controle WPC salina porção jejuno distal (100 X)**
- Figura H – grupo desafiado WPC coli porção jejuno distal (100 X)**

Setas de duas pontas indicam a altura das vilosidades

Setas pequenas de uma ponta indicam atrofia das vilosidades (vilosidades delgadas)



Anexo IV



Eriçamento de pêlos de camundongo desafiado com a bactéria *E. coli* O157:H7 (Foto 1). O mesmo não acontece no animal controle (gavagem com salina) marcado em seu dorso com fuscina (Foto 2). Este sinal clínico aparece cerca de três dias após o desafio com a bactéria.

Anexo V

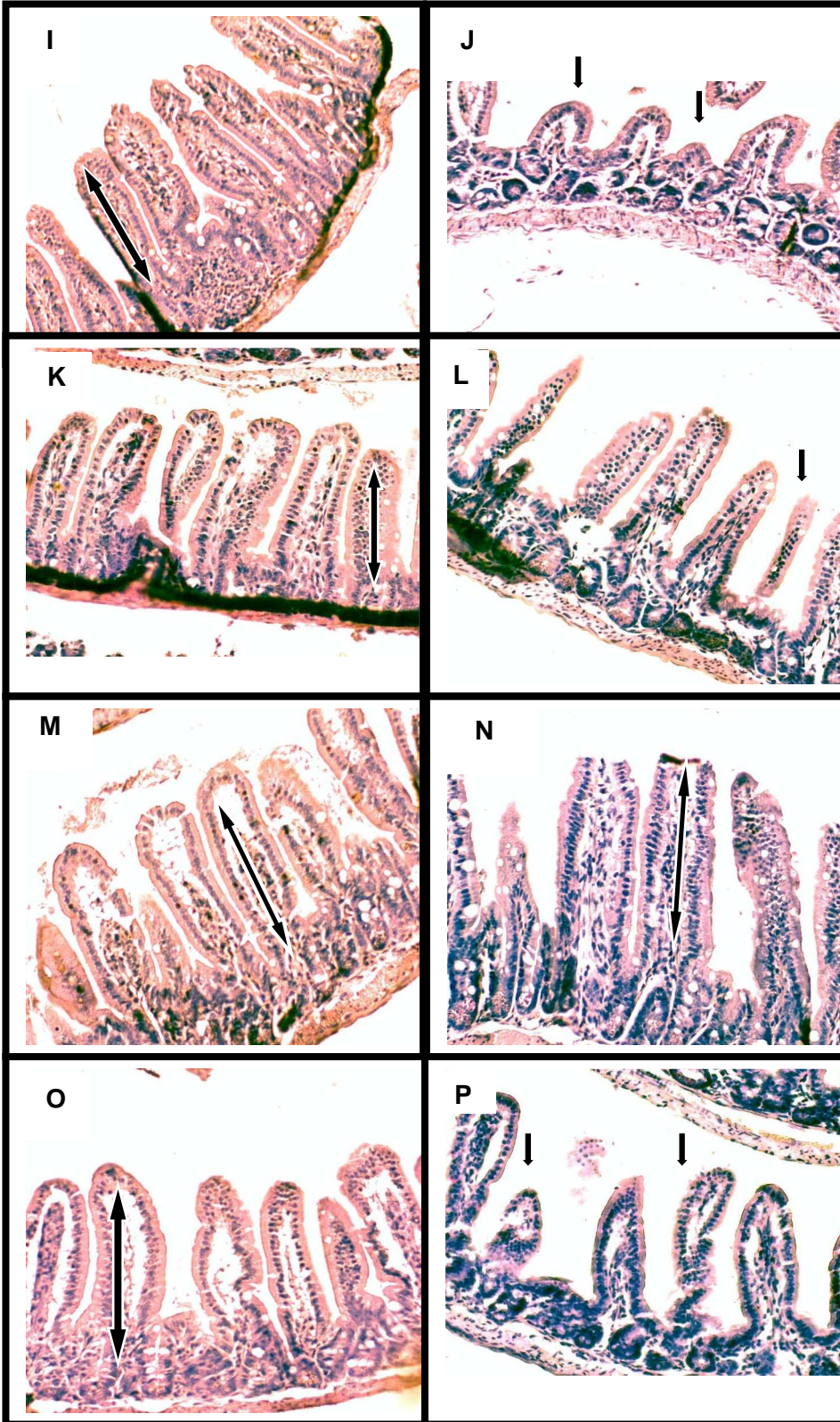
Vilosidades intestinais de íleo dos camundongos controle (gavagem com salina) e desafiados com a *E. coli* O 157: H7.

Legenda

- Figura I – grupo controle AIN93 salina porção íleo (100 X)
- Figura J – grupo desafiado AIN93 coli porção íleo (100 X)
- Figura K – grupo controle ALFA salina porção íleo (100 X)
- Figura L – grupo desafiado ALFA coli porção íleo (100 X)
- Figura M – grupo controle BETA salina porção íleo (100 X)
- Figura N – grupo desafiado BETA coli porção íleo (100 X)
- Figura O – grupo controle WPC salina porção íleo (100 X)
- Figura P – grupo desafiado WPC coli porção íleo (100 X)

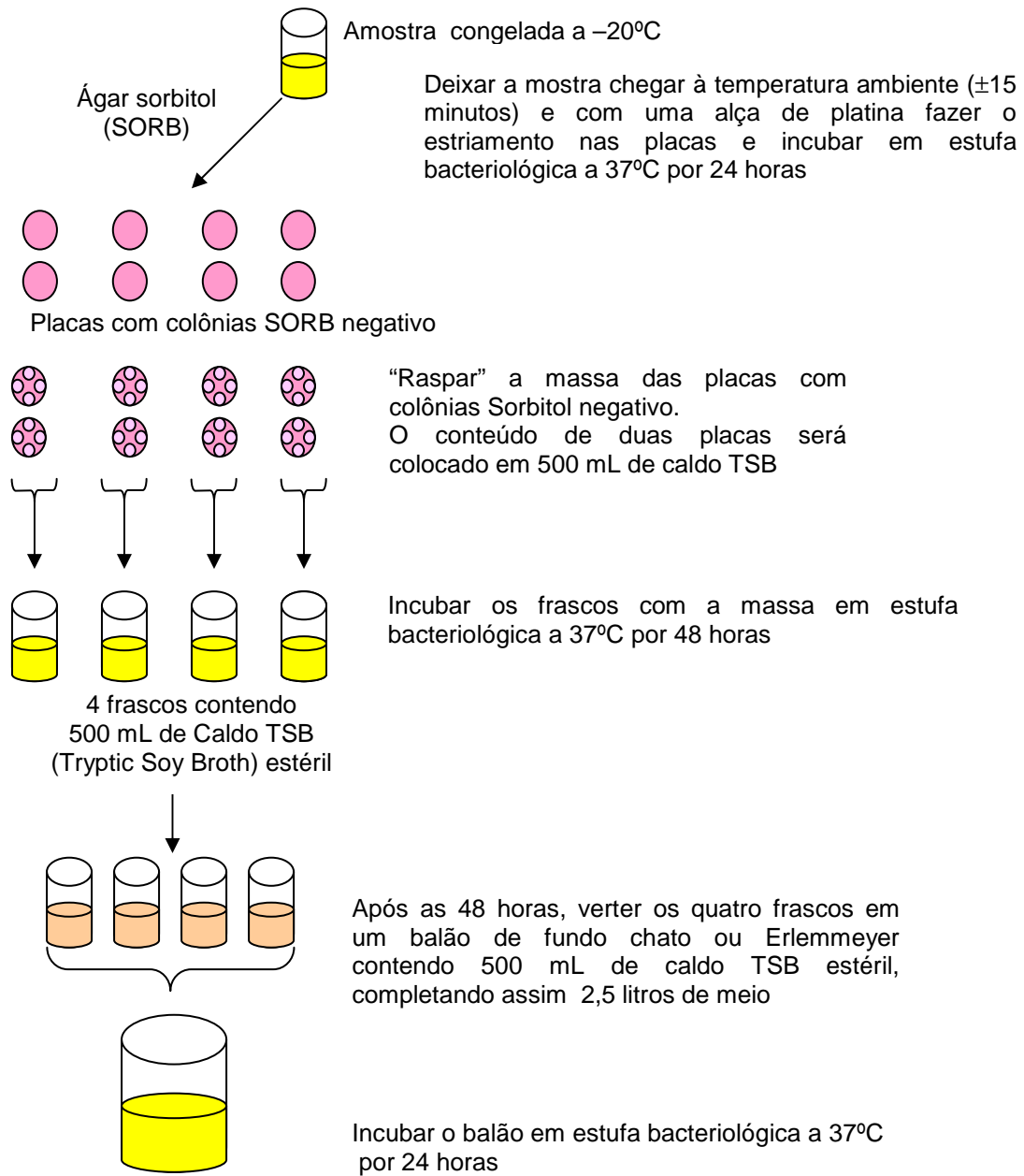
Setas de duas pontas indicam a altura das vilosidades

Setas pequenas de uma ponta indicam atrofia das vilosidades (vilosidades delgadas)

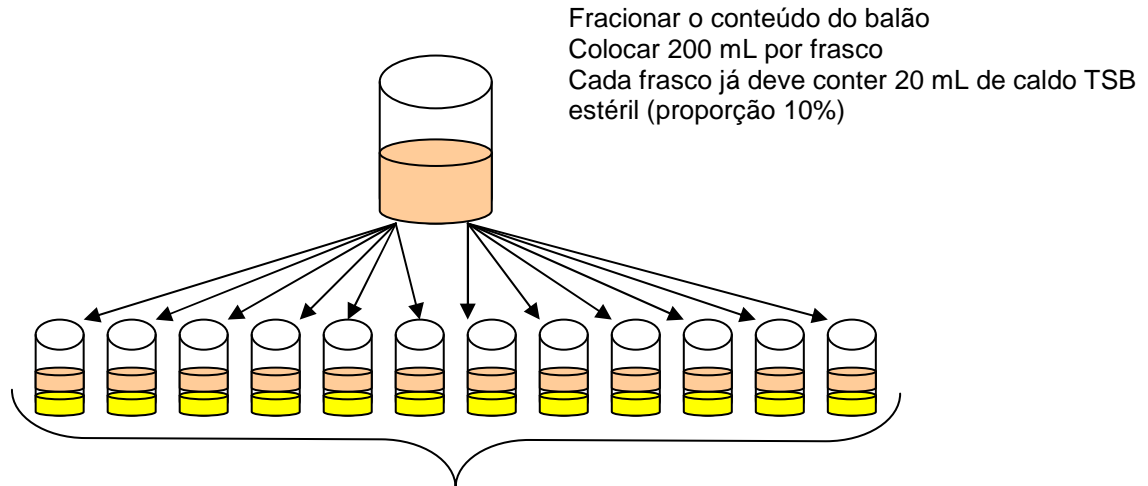


Anexo VI

Protocolo de cultivo da amostra de *Escherichia coli* O157: H7*



Cultivo da amostra de *Escherichia coli* O157: H7 (continuação)



Colocar os frascos no “shaker” ou agitador regulado em 70 r.p.m.
sob temperatura de 37°C por 20 horas

Centrifugar sob refrigeração uma vez (2.000 g por 10 minutos) para obter um “pellet”

Descartar sobrenadante

Lavar duas vezes (2.000 g por 10 minutos) com 10 mL de PBS estéril

Descartar o sobrenadante

Retirar o “pellet” com uma seringa de insulina

Fazer a inoculação via oral, por gavagem

*Adaptado de Nagano et al. (2003).