

200207500

Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de *Escherichia coli* em amostras de alfaces e de suas águas de irrigação

Autora: Patrícia Augusto de Oliveira Thiney
(Bióloga)

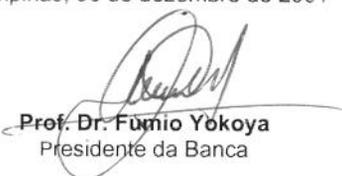
Orientador: Dr. Fumio Yokoya
(UNICAMP- FEA- Campinas-SP)

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Patrícia Augusto de Oliveira Thiney**, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de dezembro de 2001.

Campinas, 06 de dezembro de 2001

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Presidente da Banca

Campinas- S.P.

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
T 348i
V _____ EX _____
TOMADA DE 47866
PROC 16.837102
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15-02-02
Nº CPD _____

ii

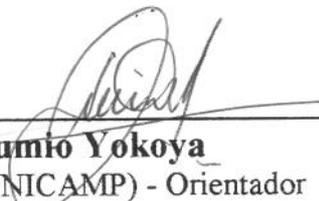
CM00163695-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

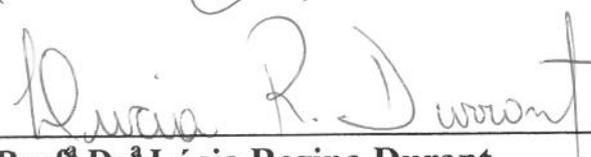
T348i Thiney, Patrícia Augusto de Oliveira
Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de
Escherichia coli em amostras de alfaces e de suas águas de
irrigação / Patrícia Augusto de Oliveira Thiney. – Campinas, SP:
[s.n.], 2001.

Orientador: Fumio Yokoya
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.*Escherichia coli*. 2.Água. 3.Reação em cadeia de
biopolímeros. 4.Alface. I.Yokoya, Fumio. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

Banca ExaminadoraAPROVADA EM 06/12/2001

Prof. Dr. Fumio Yokoya
(DCA-FEA-UNICAMP) - Orientador



Prof. Dr.ª Lúcia Regina Durant
(DCA-FEA-UNICAMP) - Membro

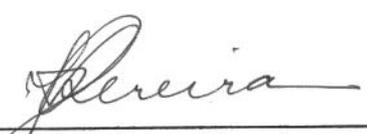


Prof. Dr. Mauro F. F. Leitão
(DTA-FEA-UNICAMP) - Membro



Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann
(USP- São José do Rio Preto) - Membro

Prof. Dr.ª Clarice Queico Fujimura Leite
(UNESP- Araraquara) - Membro



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(DCA-UNICAMP) - Suplente

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(Campinas) - Suplente

Ofereço aos meus queridos, Pierre-Louis e Isabelle, pela imensa alegria que trazem a minha vida;

Dedico aos meus pais, João Bertoldo e Maria Ilda, por sempre acreditarem que este sonho seria possível

"Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive"

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Fumiyo Yokoya, que com sua sabedoria compreendeu quais eram as preciosidades e prioridades de minha vida e sempre me impulsionou a “tocar o barco”;

À professora Dra. Mirtha Eiroa (*in memoriam*) pela prestimosa ajuda nas diretrizes iniciais deste trabalho;

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas;

Aos Professores Dr. Hideki Hayashidani e Dr. Ken-ichi Kaneko pela orientação do trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Veterinária da Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tóquio;

À Alexandre T. Okatani pela sua ajuda preciosa no decorrer do trabalho realizado no Japão e pelo conforto de poder contar com uma amizade brasileira em um laboratório tão longe de casa;

À Professora Dra. Lucia Durant e ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Microbiana do Departamento de Ciências de Alimentos da FEA pela amizade e auxílio que ajudaram a concluir este trabalho;

À querida Dra. Silene Cristina de Lima Paulillo (Tilli) e a futura Dra., Ana Lúcia Penteado, pela verdadeira amizade e por estarem sempre por perto me ajudando em inúmeras coisas que fizeram minha vida andar bem melhor;

À UNICAMP, ao Departamento de Ciências de Alimentos, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Aos membros da banca examinadora pelas consistentes sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho;

Aos meus queridos pais, João Bertoldo e Maria Ilda, por sempre me impulsionarem para frente mesmo sabendo que a frente era do outro lado do mundo;

Aos meus queridos irmãos, João Marcelo e Rodrigo, minha cunhada Vânia e meu sobrinho e afilhado Thiago Augusto, pelos bons momentos que me energizaram para novas conquistas;

Aos meus queridos sogros Jean e Babeth pelo carinho e apoio mesmo à distância;

Aos meus queridos Pierre-Louis e Isabelle, por me botarem na alma o desejo de querer ser antes de tudo “doutora” na arte de ser esposa e mãe, pois isso é melhor do que tudo e

’A Deus por me pegar no colo tantas vezes...

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Anexos.....	xi
Resumo.....	xiii
Summary.....	xv
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	03
3. Revisão Bibliográfica.....	04
3.1. Introdução.....	04
3.2. Os membros do grupo coliforme.....	06
3.2.1. Coliformes totais.....	06
3.2.2. Coliformes fecais.....	06
3.3. A espécie <i>Escherichia coli</i>	07
3.3.1. O organismo e suas características.....	07
3.3.2. Patogenicidade e sorologia.....	08
3.3.2.1. <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	09
3.3.2.2. <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	10
3.3.2.3. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EaggEC).....	11
3.3.2.4. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	11
3.3.2.5. <i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC).....	12
3.3.2.6. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	12
3.4. Dados epidemiológicos.....	21
3.5. Isolamento e identificação.....	24
3.5.1. Métodos bioquímicos e imunológicos.....	24
3.5.2. Métodos moleculares.....	29
4. Material e Métodos.....	33
4.1. Amostragem.....	33
4.2. Enumeração e isolamento.....	34
4.2.1. Petrifilme EC.....	36
4.2.2. Número Mais Provável (NMP).....	36
4.2.3. Isolamento de <i>E. coli</i> O157:H7.....	37
4.3. Caracterização das culturas puras.....	39
4.3.1. Purificação e armazenamento.....	39
4.3.2. Coloração de Gram.....	39
4.3.3. Fermentação da lactose.....	40
4.3.4. Galeria bioquímica api 20E.....	40

4.3.5. Sorologia.....	40
4.3.6. Testes em meio TSI e LIM.....	40
4.3.7. Testes em meio ID-O157:H7 e SMAC.....	41
4.3.8. Caracterização molecular.....	41
4.3.8.1. Extração dos DNAs.....	41
4.3.8.2. Amplificação dos DNAs.....	42
4.3.8.3. Eletroforese e coloração do gel.....	43
5. Resultados e Discussão.....	44
5.1. Enumeração e isolamento.....	44
5.1.1. Petrifilme EC.....	44
5.1.2. Número Mais Provável (NMP).....	45
5.1.3. Isolamento de <i>E. coli</i> O157:H7.....	49
5.2. Caracterização das culturas puras.....	50
5.2.1. Coloração de Gram.....	50
5.2.2. Fermentação da lactose.....	51
5.2.3. Galeria bioquímica api 20E.....	51
5.2.4. Sorologia.....	53
5.2.5. Testes em meio TSI e LIM.....	53
5.2.6. Testes em meio O157:H7-ID e SMAC.....	54
5.2.7. Caracterização molecular.....	56
6. Conclusões.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	60
8. Anexos (Tabelas – NMP).....	73

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Características bioquímicas da maioria das <i>E. coli</i>	08
Tabela 2. Sorotipos de EHEC isolados de crianças e adultos com diarreia, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica ou colite ulcerosa.....	20
Tabela 3. Numeração das hortas, suas localizações e/ou nomes e os números de amostras de águas e alfaces por horta.....	33
Tabela 4. Contagem de coliformes totais através do Petrifilm EC em 10 amostras de água de irrigação e 10 amostras de alface em 2 hortas na região de Campinas.....	44
Tabela 5. Distribuição do número de culturas isoladas através da técnica do NMP a partir de amostras de águas e alfaces em 2 hortas na região de Campinas.....	49
Tabela 6. Número de culturas obtidas através de isolamento em meio EC a 42°C de amostras de água e alface em 7 hortas na região de Campinas....	50
Tabela 7. Perfis bioquímicos verificados através da galeria api 20E em 20 amostras de água de irrigação e em 20 amostras de alfaces em 2 hortas na região de Campinas.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma dos testes realizados com as amostras de água de irrigação e alface de duas hortas na região de Campinas, S.P.....	35
Figura 2. Fluxograma dos testes realizados com as amostras de água de irrigação e alface de sete hortas região de Campinas, S.P.....	38
Figura 3. Eletroforese em gel de ágar à 1,5% de DNAs amplicados por PCR.....	58

LISTA DOS ANEXOS

	Página
Anexo 1. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de água de irrigação.....	73
Anexo 2. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de água de irrigação.....	74
Anexo 3. Determinação presuntiva de <i>E. coli</i> através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de água de irrigação.....	75
Anexo 4. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de água de irrigação.....	76
Anexo 5. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de água de irrigação.....	77
Anexo 6. Determinação presuntiva de <i>E. coli</i> através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de água de irrigação.....	78
Anexo 7. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de alface.....	79
Anexo 8. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de alface.....	80
Anexo 9. Determinação presuntiva de <i>E. coli</i> através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de alface.....	81
Anexo 10. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de alface.....	82
Anexo 11. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de alface.....	83

Anexo 12. Determinação presuntiva de <i>E. coli</i> através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de alface.....	84
---	----

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE *Escherichia coli* EM AMOSTRAS DE ALFACES E DE SUAS ÁGUAS DE IRRIGAÇÃO

Autor: *Patricia Augusto de Oliveira Thiney*

Orientador: *Dr. Fumio Yokoya*

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar as condições higiênico-sanitárias de alfaces e de suas águas de irrigação, isolar e identificar os perfis bioquímicos de *Escherichia coli*, bem como averiguar a ocorrência de *E. coli* portadoras de genes que codificam a produção de verotoxinas.

Foram coletadas 27 amostras de águas brutas de irrigação e 34 amostras de alfaces em 9 hortas na região de Campinas. Em 2 hortas (horta 1 e 2), realizou-se a determinação e isolamento de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli* através de placas de Petrifilm EC e da técnica dos tubos múltiplos (NMP). Foram isoladas 32 colônias típicas de *E. coli* em placas de Petrifilm EC e 210 através da técnica do NMP.

Na horta 1, a média do número de coliformes totais em 10 amostras de água de irrigação obtidas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) foi de 171 bactérias/mL, número 17 vezes maior do que o recomendado pelas normas da CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 20 de 10 de junho de 1986 para água de irrigação de hortaliças consumidas cruas. Em nove amostras os valores observados para coliformes fecais variaram de 4-49 bactérias/mL, valores superiores ao recomendado. Os valores observados para a determinação presuntiva de *E. coli* variaram de 4-23 bactérias/mL com exceção de 3 amostras que apresentaram números menores ou iguais a 2 bactérias/ml.

Na horta 2, as médias do número de coliformes totais e fecais em 10 amostras de água de irrigação obtidas pela técnica do NMP foram de respectivamente 25 e 2,6 bactérias/mL; valores estes superiores aos recomendados. Os valores observados para a determinação presuntiva de *E. coli* variaram de 0,2-2,3 bactérias/mL.

Apesar das médias do número de coliformes totais verificadas em 10 amostras de alface nas hortas 1 e 2 serem de respectivamente $6,0 \times 10^3$ e $3,3 \times 10^3$ bactérias/mL aproximadamente, e de os números observados para a determinação de coliformes fecais variarem de $<2-79$ (com exceção de uma amostra da horta 2), a maioria dessas amostras apresentou valores de *E. coli* satisfatórios pelos padrões da PHLs (Public Health Laboratory Service) para alfaces no ponto de venda, ou seja, menores do que 20 bactérias/mL.

Colônias vermelhas (β - glicuronidase-negativas) provenientes das placas de Petrifilm EC foram testadas quanto a capacidade de fermentação do sorbitol em meio Sorbitol Maconkey Ágar (SMAC) para isolamento de eventuais cepas de *E. coli* O157:H7. Nenhuma das colônias vermelhas, sorbitol-negativas, apresentaram colônias típicas de *E. coli* em meio Ágar Eosina Azul de Metileno.

Foi realizada a caracterização bioquímica de 136 isolados, Gram-negativos, lactose-positivos, provenientes das hortas 1 e 2 através da galeria bioquímica api 20E. Desses 136 isolados, 9 apresentaram perfil bioquímico inaceitável para *E. coli*. Nos outros 127 isolados, verificou-se um total de 15 perfis bioquímicos diferentes com predominância de ocorrência de um mesmo perfil bioquímico tanto para isolados de amostras de água de irrigação como para isolados de amostras de alfaces. Duas culturas isoladas, sorbitol-negativas na galeria bioquímica api 20E, foram testadas contra o antissoro O157. Ambas não apresentaram aglutinação positiva com o mesmo.

Nas hortas 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9, obteve-se o isolamento de 61 cepas de *E. coli* através da incubação em meio EC por 24 horas a 42°C. Esses isolados foram submetidos à coloração de Gram, fermentação da lactose e crescimento em meio TSI e LIM para a confirmação de *E. coli*. Posteriormente, foram testados em meios de cultura seletivos para *E. coli* O157:H7 (O157:H7-ID e SMAC). Nenhum dos isolados apresentou colônias típicas deste patógeno nos meios de cultura utilizados.

Foram submetidos à técnica de reação em cadeia por polimerase os 181 isolados confirmados como *E. coli* através da galeria api 20E (127 isolados) ou dos testes TSI/LIM (54 isolados). Com os *primers* utilizados nenhum isolado apresentou genes que codificam a produção de verotoxinas.

Isolation and characterization biochemical and molecular of *Escherichia coli* on lettuce and their water of irrigation

Author: *Patricia Augusto de Oliveira Thiney*

Adviser: *Dr. Fumio Yokoya*

SUMMARY

This research had the aim to verify the higienic sanitary conditions of lettuces and their irrigation's water, to isolate and identify the *Escherichia coli* biochemical profiles, as well to verify the occurrence of *E. coli* that carry genes for the production of verotoxins.

Twenty-seven samples of no treated irrigation's water and thirty-four samples of lettuce were collected in nine green fields in Campinas's regions.

In the green field 1, the average of the number of total coliforms in 10 irrigation water's sample obtained by the MPN technique were of 171 bacteria/mL, number 17 times bigger than the recommended by the standard of CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) in the case of irrigation's water for vegetables eating raw. In 9 samples the values observed for fecal coliforms varied from 4-49 bacteria/mL, values superior than the recommended. The values observed for *E. coli* determination varied from 4-23 bacteria/mL with the exception of 3 samples that showed values minor or equal to 2 bacteria/mL.

In the green field 2, the average of the number of total and fecal coliforms in 10 irrigation's water samples obtained by the MPN technique were respectively 25 and 2.6 bacteria/mL; values superior than the recommended. The values observed for the determination of *E. coli* varied from 0.2-2.3 bacteria/mL.

In spite of the number of total coliforms verified in 10 samples of lettuce in the green field 1 and 2 were respectively 6.0×10^3 and 3.3×10^3 bacteria/mL, and that the numbers observed in the fecal coliforms determination varied from <2-79 (with the exception of 1 sample in the green field 2), the majority of these samples showed values of *E. coli* satisfactory by the PHLS (Public Health Laboratory Service) standards for fresh vegetables in the point of sale (<20 bacteria/mL).

Red colonies (β -glucuronidase-negatives) from Petrifilm EC were tested for the capacity to ferment sorbitol in Sorbitol MaConkey Agar (SMAC) in order to isolate eventual *E. coli* O157:H7 strains. None of the red colonies, sorbitol-negatives, showed *E. coli* typical colonies in Eosin Methylene Blue Agar.

It was carried out the biochemical characterization of 136 isolates, Gram-negatives, lactose-positives, from the green fields 1 and 2 by the biochemical gallery api 20E. From these 136 isolates, 9 showed a biochemical profile unacceptable for *E. coli*. In the others 127 isolates, it was verified a total of 15 different profiles, with the predominance of a single profile as for irrigation's water as for lettuce isolates. Two isolates sorbitol-negative in api 20E gallery were tested against O157 antibody. Both didn't react positive with these antibody.

From the green fields 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9, it was obtained the isolation of 61 *E. coli* strains by the incubation in EC medium for 24 hr. at 42°C. These isolates were submitted to Gram stain, lactose fermentation, and growth in TSI/LIM media for the confirmation of *E. coli*. Later, they were tested in selective media for *E. coli* O157:H7 (O157:H7-ID and SMAC). None of the isolates showed colonies typical for this pathogen in the media used.

A total of 181 isolates confirmed as *E. coli* by api 20E (127 isolates) or by TSI/LIM (54 isolates), were submitted to the polymerase chain reaction. With the *primers* utilized none isolate showed genes for the codification of the verotoxin's production.

1. INTRODUÇÃO

Produtores e consumidores geralmente consideram frutas frescas e saladas de vegetais, alimentos seguros para serem consumidos. Por esse motivo, despreocupam-se com algumas precauções que normalmente são tomadas para outros produtos. Os alimentos associados a surtos de intoxicação alimentar geralmente são carnes de boi, frango, frutos-do-mar e laticínios. Porém, uma revisão dos casos de toxinfecções ocorridas no período de 1973 a 1987 realizada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, indicou que frutas e vegetais representam um risco de fonte de contaminação similar ao de outros produtos. Por exemplo; carne bovina, suína, aves e frutos do mar foram responsáveis por respectivamente 9%, 7%, 3% e 6% das doenças alimentares; e às frutas e vegetais (não necessariamente frescos) foram atribuídos 5% dos casos. No período de 1988-1991 foram relatados mais do que o dobro de surtos associados à estes mesmos produtos no período de 1973-1987 (BEAN & GRIFFIN, 1990).

Produtos de origem vegetal apresentam alto potencial para crescimento de microrganismos patogênicos devido às condições de cultivo, colheita, armazenamento e distribuição dos mesmos. MADDEN (1992), apontou como fonte de contaminação microbiana e condições de risco no consumo de frutas e vegetais, a contaminação da água de irrigação; o manuseio; a contaminação de caixas; os adubos orgânicos; os animais domésticos ou selvagens presentes nas proximidades de hortas e pomares; a lavagem pós-colheita; o cozimento e/ou temperatura após cozimento inadequados; o armazenamento impróprio; as novas tecnologias de empacotamento; falhas no processo de empacotamento e a contaminação cruzada com outros alimentos.

Alguns pesquisadores apontam as condições sanitárias de vegetais frescos, disponíveis em restaurantes ou vendidos prontos para consumo, como motivo de preocupação (BARNARD *et al.*, 1982; MADDEN, 1992; ABDUL-RAOUF *et al.*, 1993; ALBRECHT *et al.*, 1995; BEUCHAT, 1995; FAIN, 1996 e TAUXE *et al.*, 1997). ALBRECHT *et al.*, (1995), apresentam como fonte potencial para contaminação microbiana de saladas, o manuseio no preparo e a exposição do alimento por longo período de tempo à temperaturas inadequadas.

Além do mais, esses alimentos são ingeridos crus, sem nenhum tratamento térmico prévio que possa eliminar os contaminantes.

A variedade de microrganismos patogênicos e veículos alimentícios relatados em anos recentes, sugere que são necessárias novas estratégias de prevenção às doenças alimentares. Contudo, a identificação e controle de riscos das etapas desde o plantio até a ingestão dos vegetais, diminuem os riscos de ocorrência de doenças dentre consumidores de produtos frescos (TAUXE *et al.*, 1997).

A caracterização de microrganismos patogênicos relacionados à doenças transmitidas por consumo de produtos frescos é de grande importância a fim de se minimizar os riscos de contaminação alimentar.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo:

- Verificar as condições higiênico-sanitárias de alfaces e suas águas de irrigação,
- Isolar e identificar os perfis bioquímicos de *Escherichia coli*,
- Averiguar a nível molecular a ocorrência de *E. coli* portadoras de genes que codificam a produção de verotoxinas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Introdução

Nos últimos vinte anos foi observado nos EUA e em outros países do mundo um aumento no consumo de frutas e vegetais frescos devido, muitas vezes, a uma maior importação. Paralelamente, cresceram os surtos de doenças associadas à ingestão de produtos frescos, o que levou a uma maior preocupação, já que estes alimentos poderiam ser a causa de gastroenterites humanas (TAUXE *et al.*, 1997 e BEUCHAT, 1995).

Algumas vezes os surtos de doenças alimentares aumentam durante o verão. Tais surtos, nem sempre são bem compreendidos, mas é provável que estejam relacionados à frutas frescas e vegetais, já que seus consumos aumentam nesta época (BEUCHAT, 1995).

Os microrganismos patogênicos capazes de promover doenças alimentares por consumo de saladas frescas são bactérias, vírus e parasitas. Contudo, as bactérias são a maior preocupação em termos de doenças graves e número de pessoas com risco de infecção a nível mundial (BEUCHAT, 1995); além disso, o freqüente isolamento de bactérias do solo evidenciam que este seja a principal fonte de patógenos de frutas e vegetais (MADDEN, 1992). Três gêneros destes microrganismos, *Listeria*, *Yersinia* e *Aeromonas*, são psicrotóxicos e portanto capazes de crescer em temperaturas de refrigeração (FAIN, 1996).

Existem muitos pontos na cadeia de produção de alimentos frescos que são fonte potencial de contaminação microbiana. A contaminação pré-colheita pode ser resultado do uso de água contaminada na irrigação, emprego de adubos orgânicos, ou fezes humanas ou de animais. Já a contaminação pós-

colheita ocorre como resultado de uso de água de lavagem não potável, manuseio impróprio, presença de animais ou outra fonte de patógenos no meio, emprego de caminhões ou caixas contaminados e contaminação cruzada com outros produtos (TAUXE *et al.*, 1997).

Durante e após a finalização do processo de produção do alimento, higiene básica, controle de temperatura de armazenamento e condições de transporte são importantes; além disso, a qualidade da água usada na produção e no processo, também deve ser observada, devido ao potencial de amplificação que pode ocorrer caso a água de lavagem esteja contaminada (TAUXE *et al.*, 1997). FAIN (1996), citou que os fatores que intensificam os riscos de contaminação alimentar causados por salada são o alto conteúdo de umidade nas saladas frescas, a ausência de tratamento térmico e a exposição à temperaturas inadequadas.

Os valores médios de conteúdo de água (88%), carboidratos (8,6%), proteínas (1,9%), gorduras (0,3%) e cinzas (0,84%) encontrados nos vegetais revelam que do ponto de vista de conteúdo nutricional, os vegetais são capazes de permitir o crescimento de fungos, leveduras e bactérias. O alto conteúdo de água favorece o crescimento de bactérias e o baixo conteúdo de carboidratos e gorduras sugere que muita desta água encontra-se em forma disponível para o crescimento microbiano. Os limites de variação do pH de muitos vegetais encontram-se dentro de uma faixa que permite o crescimento de muitas bactérias. O alto potencial de oxi-redução dos vegetais sugere que os tipos aeróbios e anaeróbios facultativos apresentam vantagens para crescimento (JAY, 1996).

TAUXE *et al.* (1997) citaram quatro fatores como determinantes na sobrevivência, crescimento e inativação de microrganismos em produtos frescos. São eles: as características do microrganismo, o estado fisiológico do tecido vegetal e sua resistência aos processos metabólicos microbiológicos, as características do meio ambiente ao redor do tecido vegetal (p. ex.: pH, atividade de água, composição atmosférica), e o efeito do processo de produção na população microbiana ou no metabolismo da planta.

Organismos indicadores são utilizados para se verificar a pureza da água. Os níveis de *Escherichia coli* são freqüentemente usados para monitorar as

condições sanitárias sob as quais os alimentos são processados (ODUMERU *et al.*, 1997). Esses são microrganismos associados com o trato intestinal, cuja presença na água indica que a mesma recebeu contaminação de origem intestinal. O indicador mais largamente utilizado são os microrganismos do grupo dos coliformes fecais que compreendem uma variedade de microrganismos; na maioria de origem intestinal. Na prática, os microrganismos deste grupo são quase sempre membros do grupo das bactérias entéricas. Os coliformes fecais podem ser usados como indicadores porque eles são habitantes comuns do trato intestinal de humanos e animais de sangue quente, onde geralmente estão presentes em grande quantidade (BROCK *et al.*, 1994).

3.2. Os membros do grupo coliforme

3.2.1. Coliformes totais

Este grupo inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Em geral, o grupo dos coliformes é apresentado por 4 gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Ocasionalmente linhagens de *Arizona hinshawii* e *Hafnia alvei* fermentam lactose, mas geralmente não dentro de 48 horas e algumas linhagens de *Pantoea agglomerans* são lactose positivas dentro de 48 ± 3 horas (JAY, 1996). A presença de coliformes totais em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA *et al.*, 1997).

3.2.2. Coliformes fecais

A definição é a mesma da de coliformes totais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 ± 2 hrs. a 44,5-45,5°C. Este grupo inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem linhagens de origem não fecal (SILVA *et al.*, 1997).

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. SCHARDINGER (1892 citado por JAY, 1996) foi o primeiro a sugerir o uso deste microrganismo como indicador da poluição fecal. Segundo SILVA *et al.* (1997), a *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento.

Os microrganismos do grupo dos coliformes crescem em uma ampla faixa de temperatura, já tendo sido observado crescimento em temperaturas extremas de -2°C a 50°C. Em alimentos, o crescimento costuma ser muito lento a 5°C, embora muitos autores tenham verificado crescimento entre 3-6°C. A faixa de pH que permite o crescimento deste grupo de microrganismos é de 4,4-9,0. *E. coli* pode crescer em um meio mínimo contendo somente uma fonte orgânica de carbono, como glicose e uma fonte de nitrogênio como (NH₄)₂SO₄ e outros minerais, sendo também capaz de crescer na presença de sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram positivas; característica esta utilizada na composição de meios seletivos. Os coliformes crescem bem em ágar nutriente e produzem colônias visíveis dentro de 12-16 horas a 37°C (JAY, 1996).

3.3. A espécie *Escherichia coli*

3.3.1. O organismo e suas características

Escherichia é o gênero tipo da família das Enterobacteriaceae e *E. coli* é a espécie tipo do gênero (ADAMS & MOSS, 1995). O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* e *E. vulneris* (HOLT *et al.*, 1994); porém, a única espécie de importância prática é a *E. coli* (TRABULSI, 1991).

As *E. coli* são pequenos bacilos, Gram negativos, não esporulados, frequentemente móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos e oxidase negativos, que fermentam os açúcares com produção de gás e apresentam crescimento mesofílico de 7-10°C a 50°C com temperatura ótima de crescimento ao redor de 37°C, embora já tenha sido relatado o crescimento de *E. coli* enterotoxigênica a 4°C. Além disso, as *E. coli* não apresentam alta

resistência térmica, com um valor D a 60°C na ordem de 0,1 minuto e podem sobreviver refrigeradas ou congeladas por longos períodos de tempo. Um pH próximo do neutro é considerado ótimo para crescimento, mas sob condições favoráveis poderá haver crescimento mesmo em pH 4,4. A atividade de água (Aa) mínima para crescimento é de 0,95 (ADAMS & MOSS, 1995). A Tabela 1 apresenta as características bioquímicas verificadas na maioria das *E. coli*.

Tabela 1. Características bioquímicas da maioria das *E. coli*.

Características	Reações
Utilização do citrato	-
Hidrólise de gelatina	-
Produção de H ₂ S	-
Produção de urease	-
Reação de Voges-Proskauer	-
Oxidase	-
Fermentação do manitol	+
Fermentação da lactose	+
Fermentação da glicose com produção de gás	+
Fermentação do sorbitol	+
Produção de indol	+
Produção de lisina descarboxilase	+
Reação de vermelho de metila	+
Motilidade	+

Fonte: Adaptado de KELLY *et al.* (1985)

3.3.2. Patogenicidade e sorologia

Linhagens de *E. coli* não patogênicas constituem parte da microbiota de anaeróbios facultativos normalmente encontrados no trato intestinal de humanos e animais de sangue quente (DOYLE *et al.*, 1997). Contudo, algumas *E. coli* podem ser patogênicas quando encontram oportunidade; assim, essa bactéria é considerada um patógeno oportunista. Como patógeno, a *E. coli*

pode causar diarreia, infecção no trato urinário, septicemia, apendicite e meningite neonatal tanto no homem como em animais (MOLEND, 1994).

Esta espécie, compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de antissoros preparados contra as 3 variedades de antígenos de superfície que ocorrem na espécie: antígenos O (somático), H (flagelar) e K (capsular, onde K vem da palavra alemã *kapsel* que significa cápsula). Nem todas as amostras de *E. coli* apresentam os 3 tipos de antígenos ao mesmo tempo. Por exemplo, uma variável das amostras é rugosa e portanto não tem o antígeno O, muitas não possuem o antígeno K e outras são imóveis, isto é, não possuem flagelos; por exemplo, O111:H-, onde o sinal - indica ausência de flagelos (TRABULSI, 1991).

Dentre uma minoria de linhagens de *E. coli* que são patogênicas para o homem, pode-se subdividi-las em 6 grupos, baseando-se nas propriedades de virulência, mecanismos da patogenicidade, sintomas da doença, diferenças epidemiológicas, seu efeito em certas células de cultura e diferenças sorológicas; são estes: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroagregativa (EAggEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) (PADHYE & DOYLE, 1992; JAY, 1996) e de aderência difusa (DAEC) (DOYLE *et al.*, 1997).

Frutas e vegetais podem ser contaminados com um ou mais desses grupos enquanto no campo ou durante o manuseamento pós-colheita (BEUCHAT, 1999).

3.3.2.1. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são o agente causal da diarreia aquosa, semelhante à cólera, na qual ocorre aderência das bactérias às células epiteliais do intestino delgado, produzindo uma ou mais enterotoxinas termolábeis ou termoestáveis. As primeiras são conhecidas pelas siglas LT I e LT II e as segundas, pelas siglas Sta e Stb. As amostras isoladas de seres humanos raramente produzem as enterotoxinas LT II e nunca a STb. Além de produzir as enterotoxinas LT I e Sta, as ETEC apresentam fimbrias, cuja função é fixá-las à mucosa do intestino

delgado. Estas fimbrias, também conhecidas como fatores de colonização, são proteínas imunogênicas (TRABULSI, 1991).

Nos países em desenvolvimento, as ETEC estão associadas à diarreia conhecida como “diarreia dos viajantes” (PADHYE & DOYLE, 1992; SHUTHERLAND *et al.*, 1995 citado por SILVA *et al.*, 1997). Muitos estudos foram realizados em grupos de americanos que viajaram ao México. Tais estudos mostraram que a taxa de infecção por estes microrganismos é freqüentemente alta, maior do que 50% e que os primeiros veículos são os alimentos crus, tais como salada de alface e a água (BROCK *et al.*, 1994).

Um estudo de casos de “diarreia dos viajantes” na cidade do México, revelou as ETEC como fonte de contaminação em 45% dos casos. A doença foi associada ao consumo de saladas contendo vegetais crus (MERSON *et al.*, 1976).

Em 1993, em Rhode Island, EUA, 47 passageiros de uma companhia aérea contaminaram-se após o consumo de salada verde composta por 3 diferentes tipos de alface e cenoura ralada. O agente causador da doença foi determinado como sendo ETEC. Neste mesmo ano, 78 hóspedes em New Hampshire, adoentaram-se após a ingestão de salada composta por cebola, cenoura, pimenta, brócoli, fungo e tomate (ABDUL-RAOUF *et al.*, 1993; FAIN, 1996 e TAUXE *et al.*, 1997). Em ambos os casos, isolou-se ETEC sorotipo O6: não móvel (NM), que produz tanto toxinas estáveis como instáveis ao calor. O perfil do plasmídeo dessas linhagens era indistinguível entre eles, mas diferia daquele de outras linhagens também ETEC O6: NM, sugerindo que os dois surtos estariam ligados. Este caso, ilustra bem a importância da subtipificação molecular em investigação epidemiológica (TAUXE *et al.*, 1997).

Os principais sorogrupos O associados à patogenicidade nesta categoria são os seguintes: 6, 8, 15, 20, 25, 63, 78, 115, 128 e 148 (TRABULSI, 1991).

3.3.2.2. *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

As EPEC são o agente causal da diarreia infantil e de recém-nascidos. Muitos adultos são portadores e raramente expressam sintomas da doença, logo acredita-se que a imunidade seja adquirida com o passar do tempo (PADHYE & DOYLE, 1992).

JAY (1996) citou que embora causem diarreia, estas linhagens geralmente não produzem enterotoxinas. Porém, CLEARY *et al.* (1985) citado por PADHYE & DOYLE (1992), verificaram que algumas linhagens de EPEC produzem toxinas, particularmente verotoxinas, diferentes de enterotoxinas de ETEC.

Os principais sorogrupos associados à patogenicidade nesta categoria incluem O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, O142 e O158 (DOYLE *et al.*, 1997; TRABULSI, 1991).

Vários estudos demonstraram que em cada sorogrupo O, somente determinados biosorotipos são regularmente associados à diarreia. No Brasil, os mais comuns são O111:H-, O111:H2 e O119:H6 (TRABULSI, 1991).

3.3.2.3. *E. coli* enteroagregativa (EAggEC)

Este grupo, também designado por enteroaderente, relaciona-se às EPEC porém, as fímbrias de aderência são únicas deste grupo. A característica clínica que distingue as EAggEC é a persistência de diarreia por mais de 14 dias, especialmente em crianças (COHEN *et al.*, 1993 citado por JAY, 1996). Essas linhagens são produtoras de toxina termoestável e o mecanismo pelo qual causam diarreia aquosa não está elucidado. Ainda permanece incerto se membros deste grupo são patógenos alimentares (JAY, 1996).

3.3.2.4. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Provoca diarreia através da invasão das células epiteliais do intestino grosso, causando necrose no tecido epitelial do cólon e diarreia sanguinolenta. Os sintomas são semelhantes ao da shigelose e a característica de invasividade, tanto da EIEC como da *Shigella*, está relacionada à presença de um grande

plasmídeo de 140 Mda (DuPont *et al.*, 1971 citado por PADHYE & DOYLE, 1992).

Os sorogrupos desta categoria mais associados à doença são: O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 e O167. Dentre esses, o sorogrupo O124 é o mais freqüente (DOYLE *et al.*, 1997).

3.3.2.5. *E. coli* de aderência difusa (DAEC)

Esse grupo de bactérias tem sido associado com diarreia em crianças no México. Podem produzir diarreia branda sem sangue ou leucócitos fecais e são identificadas por um padrão de aderência difusa em células Hep-2 (linhagem de células epiteliais de ratos) ou HeLa (células de mamíferos usadas para verificar tipo de aderência).

As DAEC geralmente não produzem toxinas ou possuem plasmídeos que codificam fatores de aderência (DOYLE *et al.*, 1997).

3.3.2.6. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Desde que em 1982 a *E. coli* O157:H7 foi pela primeira vez reconhecida como um patógeno em alimentos (RILEY *et al.*, 1983), muitos surtos ocorreram relacionados a este microrganismo, ou a sorogrupos de *E. coli* incluindo O26:H11, O103, O104, O111, O113:H21, O153, O163 e O157:H-sorbitol positivo, que por estarem associadas a casos de diarreia sanguinolenta, também foram identificadas como EHEC (NAGANO *et al.*, 1998). Embora a maioria desses surtos tenham sido associados ao consumo de carne bovina, alguns foram associados ao consumo de frutas e vegetais. Águas rurais, tanto para beber como para recreação, estão cada vez mais sendo reconhecidas como veículos importantes de transmissão de EHEC O157 (GRIFFIN *et al.*, 2000).

A bactéria *E. coli* O157:H7 tem sido citada por muitos autores como agente causador de surtos de gastroenterites decorrentes da ingestão de produtos frescos, sendo por isso, reconhecida como um microrganismo patogênico emergente (DEL ROSARIO & BEUCHAUT, 1995; STEELE *et al.*, 1982; ACKERS *et al.*, 1996 e MERMIN *et al.*, 1996 citado por TAUXE *et al.*,

1997). É sabido que esses surtos ocorreram provavelmente devido à contaminação cruzada com EHEC proveniente de outros produtos, tal como carne bovina.

Ruminantes, particularmente os bezerros, são o principal reservatório animal de *E. coli* O157:H7. Possíveis fontes de contaminação são: a ração animal, água, animais contaminados no rebanho, humanos ou animais selvagens infectados ou equipamentos do abatedouro contaminados com fezes. Predominantemente, as *E. coli* O157:H7 são isoladas de animais jovens, com a maior taxa de isolamento sendo encontrada em bezerros recém desmamados (ZHAO *et al.*, 1995). Porém, em animais, este microrganismo não causa diarreia ou alguma doença aparente (CRAY & MOON *et al.*, 1995).

A excreção em gados é maior durante o verão e início do outono, coincidindo com o pico sazonal das infecções em humanos. Segundo WANG *et al.* (1996), a *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por muitas semanas em fezes bovinas e no adubo.

Linhagens de *E. coli* O157:H7 bem como de EHEC não-O157 têm sido isoladas de fezes de ovelhas, cabras, cavalos, cervos e gaivotas. A excreção de linhagens não-O157 é particularmente mais freqüente em ovelhas e cabras, mas foi também encontrada em menor freqüência em suínos, gatos e cachorros. Contudo, a maioria das linhagens de EHEC não-O157 isoladas destes animais não possuem o gene *eae* requerido para a expressão da patogenicidade desta bactéria em humanos. Embora essas linhagens devam ser menos virulentas, linhagens de EHEC *eae*-negativas foram identificadas na Alemanha em 34,5% de pacientes com enterites e em 4,3% de pacientes acometidos de HUS (Síndrome Urêmica Hemolítica) (BOCKEMUHT *et al.*, 1997 citado por KARCH *et al.*, 1999).

MARTINS *et al.* (2000), estudaram as características fenotípicas e genotípicas associadas ao processo patogênico de 91 isolados de *E. coli* obtidos de fezes normais ou diarreicas de suínos recém-nascidos (0-11 dias de idade) coletadas em 3 estados do Brasil; São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Genes para a produção de toxinas (LT-I, STa, SLT-I, SLT-II, SLT-IIv) individualmente ou combinados foram encontrados na maioria (65,7%) das linhagens isoladas de fezes diarreicas e em 42,8% das linhagens isoladas de

fezes normais. O gene *eae* foi observado em 25,7% e 9,5% dos isolados de fezes diarreicas e normais respectivamente. Esses mesmos autores, acreditam que as linhagens de *E.coli* de origem suína, isoladas no Brasil, abrigam uma grande variedade de fatores de patogenicidade e que devido às condições sanitárias empregadas no trato com esses animais, este patógeno pode ser transmitido para outros hospedeiros, como gados e frangos. MARTINS *et al.* (2000), sugerem que no Brasil, os suínos, podem agir como um reservatório de transmissão de linhagens de *E. coli* para outros animais.

As estirpes de *E.coli* O157:H7 são organismos anaeróbios facultativos mesófilos, que crescem na faixa de pH próxima à neutralidade. A maioria das reações bioquímicas de *E.coli* O157:H7 são típicas de *E. coli*, porém uma das diferenças relaciona-se à fermentação do sorbitol (WELLS *et al.*, 1983) e à atividade da β -glicuronidase (DOYLE & SCHOENI, 1984). Aproximadamente 93% das *E. coli*, isoladas de origem humana, fermentam o sorbitol dentro de 24 horas; contudo, a *E.coli* O157:H7 não o faz; adicionalmente, 93% das estirpes de *E. coli* possuem a enzima β -glicuronidase (WELLS *et al.*, 1983), mas a atividade desta enzima não é fenotipicamente expressa por *E.coli* O157:H7 (PADHYE & DOYLE, 1992). Outras características importantes são a descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina (HALDANE *et al.*, 1986) e a não-fermentação da rafinose e do dulcitol (DOYLE & SCHOENI, 1984).

Estudos de crescimento em Caldo Trypticase de Soja (TSB) indicaram que as EHEC crescem rapidamente entre 30-42°C e que a 44-45°C o crescimento é muito lento (DOYLE & SCHOENI, 1984); sendo assim, a *E. coli* O157:H7 provavelmente não seria detectada em prova para coliformes fecais com procedimento padrão de incubação a 44,5°C (RAGHUBEER & MATCHES, 1990).

O intervalo de temperatura para multiplicação de *E. coli* O157:H7 e produção de gás em meio EC em 48 h é de 19,3-41°C. Crescimento sem produção de gás foi observado a 16,4 e 42,5 °C (DOYLE, 1991).

Estudos sobre a sensibilidade térmica de *E. coli* O157:H7 em carne bovina revelaram que o patógeno não apresenta resistência incomum ao calor, com valores D a 57,2; 60; 62,8 e 64,3°C de 270, 45, 24 e 9,6 segundos, respectivamente (DOYLE & SCHOENI, 1984), sendo que a pasteurização do

leite (72°C/16,2 s) mata mais do que 10^4 células de *E. coli* O157:H7/mL (D'AOUST *et al.*, 1988). O aquecimento de alimentos de origem animal a uma temperatura interna de pelo menos 68,3°C é um importante ponto crítico de controle para se assegurar a inativação destes microrganismos (DOYLE *et al.*, 1997).

O mecanismo pelo qual as *E. coli* O157:H7 provocam doenças não foi ainda totalmente elucidado; no entanto, vários fatores têm sido associados com a virulência deste microrganismo. Um deles é a produção de uma ou mais verotoxinas (VT).

As linhagens enterohemorrágicas de *E. coli* produzem fatores citotóxicos para células do rim (Vero) de macacos verdes africanos, que foram descritos como verotoxinas ou Shiga-like toxinas (SLT) devido à similaridade entre VT1 e Shigatoxinas (Stx) produzidas pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I (WEAGANT *et al.*, 1995; DOYLE *et al.*, 1997).

Na *E. coli* O157:H7 a VT1 é imunologicamente indistinguível da Stx e é também idêntica quanto às atividades biológicas, ou seja, citotoxicidade à células HeLa, letalidade em camundongos e enterotoxicidade observada em alça ligada de coelhos. Devido a estas similaridades, o termo toxina “Shiga-like” (SLT) é utilizado para referir-se à toxina, a qual é denominada Stx ou VT1 (PADHYE & DOYLE, 1992).

Outra VT produzida por *E. coli* O157:H7 é antigenicamente diferente da VT1, não é neutralizada por antitoxina Shiga e recebe a denominação STII ou VT2. Esta toxina é uma molécula mais distinta com somente 56% de aminoácidos homólogos à toxina VT1. Apesar de suas diferenças imunológicas, VT1 e VT2 são semelhantes em suas atividades biológicas, apresentando o mesmo mecanismo de ação (PADHYE & DOYLE, 1992). Ambas as toxinas são codificadas por um bacteriófago inserido no cromossomo da *E. coli* O157 (MEAD & GRIFFIN, 1998).

Muitas variantes da verotoxina VT2 foram relatadas, caracterizadas e nomeadas VT2vha (isolada de paciente com HUS), VT2vhb (isolada de paciente com HUS), VT2vp1 (isolada de suínos) e VT2vp2 (isolada de criança com diarreia). Foram desenvolvidos *primers* específicos para a identificação

dos genes VT2vp1, VT2vha e VT2vhb através da técnica do PCR. LIN *et al.* (1993), desenvolveram *primers* comuns para os genes VT1, VT2 e suas variantes, possibilitando a detecção de todas essas verotoxinas com um único par de *primers*.

A produção de verotoxinas por si só não é suficiente para causar a doença. Outro fator que contribui para a virulência de *E. coli* O157 inclui um plasmídeo de 60Mda, responsável pela aderência do patógeno às células do intestino (PADHYE & DOYLE, 1992).

Um outro plasmídeo, de aproximadamente 90 Kilobases (Kb) (pO157) está presente na maioria dos isolados clínicos de *E. coli* O157:H7 e muitos estudos foram realizados para se determinar a função do pO157 (LEVINE *et al.*, 1987), porém, enquanto alguns estudos revelaram que este plasmídeo estaria envolvido na aderência da bactéria, outros não puderam confirmar essas observações.

O sorogrupo EHEC geralmente abriga o plasmídeo que carrega o gene *ehx* que codifica uma hemolisina. Esta hemolisina está associada à isolados de *E. coli* produtoras de Shiga-toxina (STEC) em humanos mas seu exato papel na patogenicidade de STEC permanece desconhecido (BOERLIN *et al.*, 1999).

As bactérias *E. coli* O157:H7 parecem causar a doença através da sua habilidade de adesão às membranas das células do hospedeiro (possivelmente invadindo-as) e então produzindo VT1 e/ou VT2. Fatores de aderência, VT1 e VT2, são críticos na patogenicidade da infecção por estes microrganismos (DONNENBERG & KAPER, 1992).

O patógeno coloniza as células do intestino através de um mecanismo denominado A/E (*attachment/effacement*). Esta lesão é caracterizada por uma ligação íntima entre as bactérias e as células do intestino. A aderência é mediada pela intimina, uma proteína de membrana externa de 94-KDa codificada pelo locus *eaeA* (DONNENBERG & KAPER, 1992). As proteínas de membrana externa de *E. coli* O157:H7 parecem servir como adesinas que se ligam às células do hospedeiro (SHERMAN *et al.* 1991).

A intimina é o produto do gene *eaeA* de *E. coli* O157:H7. Ela é necessária para ligação íntima desta bactéria às células do intestino levando à formação da lesão A/E. Porém, o gene *eaeA* sozinho não pode levar à lesão A/E, fatores adicionais da bactéria e outros genes também parecem participar deste processo.

O gene *eaeA* está localizado em uma região do cromossomo (ilha de patogenicidade) denominada LEE, *Locus Enterocyte Effacement*. Esta região é o local de inserção de genes que codificam fatores de virulência (FRANKEL *et al.*, 2000).

O termo fator de virulência não é precisamente definido já que um único componente pode não ser suficiente para transformar uma linhagem não patogênica em uma patogênica, mas somente poderia fazê-lo em combinação com outros determinantes de virulência. KUHNERT *et al.* (2000), utilizaram o termo fator de virulência para determinantes que têm uma contribuição majoritária para o potencial patogênico de uma determinada linhagem.

As análises de surtos alimentares relacionados à STEC principalmente às do sorogrupo O157:H7 estabeleceram três principais rotas de transmissão: alimentos ou água contaminados, transmissão pessoa-pessoa, e contato com animais (KARCH *et al.*, 1999).

Três principais manifestações de doenças têm sido atribuídas à *E. coli* O157:H7: colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombocitopênica trombótica (PADHYE & DOYLE, 1992).

As características da colite hemorrágica são: o aparecimento súbito de dores abdominais, seguidas por diarreia aquosa que persiste por 24 horas e posteriormente se torna sanguinolenta. Pode ocorrer vômito, porém febre é rara. O período de incubação varia de 3 a 9 dias (PADHYE & DOYLE, 1992). A colite hemorrágica, em 10% dos casos, principalmente em crianças, resulta no quadro conhecido como HUS no qual os eritrócitos são destruídos comprometendo o funcionamento dos rins (MENG *et al.*, 1994). A média de ocorrência de morte nesta doença é de 2-7% dos pacientes (FEATHERSTONE, 1997).

Púrpura trombocitopênica trombótica é similar à HUS, porém na primeira há o comprometimento do sistema nervoso central. Outras complicações clínicas associadas às infecções causadas por *E. coli* O157:H7 incluem cistite hemorrágica, convulsão e anemia (PADHYE & DOYLE, 1992).

Uma análise retrospectiva de alimentos associados a surtos de infecção de *E. coli* O157:H7, revelou que a dose infectiva deste microrganismo é baixa. Por exemplo, entre 0,3 e 15 células de *E. coli* O157:H7/g foram encontradas em lotes de carne bovina congelada associados com um grande surto de infecção alimentar nos EUA (GRIFIN *et al.*, 1994 e ZHAO *et al.*, 1994 citados por DOYLE *et al.*, 1997). Similarmente, 0,3 a 0,4 células de *E. coli* O157:H7/g foram detectadas em salames empacotados que foram associados com surtos de infecção alimentar (CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995 citado por DOYLE *et al.*, 1997) Esses dados sugerem que a dose de infecção de *E. coli* O157:H7 é baixa, < do que 100 células. Evidência adicional para uma baixa dose de infecção é a capacidade de transmissão deste microrganismo de pessoa para pessoa.

A habilidade deste patógeno para tolerar condições ácidas provavelmente permite sua sobrevivência no meio ácido do estômago (DOYLE *et al.*, 1997).

E. coli O157:H7 é capaz de multiplicar-se em vegetais prontos para o consumo como alface, pepino e cenoura; em temperaturas que variam de 12-21°C e em cubos de melão a 25°C. A 5°C esta bactéria pode sobreviver em cubos de melão por 34 horas e por mais 14 dias nas amostras de alface, pepino e cenoura (ABDUL-RAOUF *et al.*, 1993; DEL ROSÁRIO & BEUCHAUT, 1995).

As bactérias mundialmente mais isoladas de pacientes com HUS são as *E. coli* produtoras de verotoxina (VTEC) do sorotipo O157:H7; porém, outros sorogrupos foram relacionados à esta doença (O26, O55, O103, O111, e O128) (TARR & NEILL, 1996; BLANCO *et al.*, 1996), mas é provável que as suas incidências sejam subestimadas, pois o isolamento de VTEC não-O157:H7, ainda permanece um desafio. Ao contrário da maioria dos isolados de O157:H7, a maior parte das linhagens de VTEC não-O157:H7 fermentam o

sorbitol e portanto não podem ser isoladas através de crescimento em meios como sorbitol-MacConkey-agar (BONNET *et al.*, 1998).

Segundo BLANCO *et al.* (1996), apesar dos surtos de infecção alimentar estarem associados a somente 7 sorotipos O?:H19, O111:H-, O117:H4, O121:H19, O145:H-, O157:H7 e O157:H-, as EHEC causadoras de infecções em seres humanos pertencem a vários sorotipos, tendo-se detectado a produção de verotoxinas em linhagens pertencentes a aproximadamente 50 sorogrupos O diferentes (Tabela 2). Estes mesmos autores citaram que as EHEC dos sorotipos O26:H11, O103:H2, O111:H- e O113:H21 são as que adquirem maior importância clínica depois das do sorotipo O157:H7.

O diagnóstico microbiológico de STEC não-O157 é complicado devido a ausência de propriedades bioquímicas ou de crescimento que permitam sua distinção de linhagens de *E. coli* da biota entérica normal e devido sua larga diversidade (JOHNSON *et al.*, 1996). Como a produção de Shiga toxina é a única característica comum à todas STEC não-O157, os métodos para rastreamento e isolamento dessas linhagens são baseados na detecção desta toxina ou de genes *stx*. Métodos baseados na produção de Shiga toxina apresentam a vantagem de detectar tanto linhagens de STEC O157 sorbitol-positivo como sorbitol-negativo (KARCH *et al.* 1999).

Segundo JOHNSON *et al.* (1996), o avanço de técnicas moleculares para identificar sequências gênicas *stx* e de técnicas imunológicas para detectar a expressão deste gene, leva ao reconhecimento de um aumento do número de surtos e casos esporádicos de infecção humana causada por STEC não-O157. Esses mesmos autores acreditam que a severidade das infecções causadas por STEC e o aumento do número de casos constatados mundialmente tornam as bactérias do sorogrupo O157:H7 e não-O157:H7 preocupantes com respeito à saúde pública.

Tabela 2. Sorotipos de EHEC isolados de crianças e adultos com diarreia, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica ou colite ulcerosa.

Diarreia e/ou colite Hemorrágica ^{a,b}	Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS)	Colite ulcerosa e outros
O2:H1,H6,H29	O1:H?	Colite ulcerosa
O4:H10,H- O5	O2:H5,H6	
O6:H28,H- O20	O5:H-	O2:H5
O22:H16	O6:H-	O7:K7
O23:H7,H16	O8:H14	O91:H14
<u>O26:H11,H-</u>	O9ab:H-	
O38:H21	O15:H-	Outros ^c
O44	O18:H?	
O45:H2,H- O50	O22:H1,H8	O1:H-
O52:H19,H25	O25:K2:H2	O2:H7
O55:H6,H7,H19	<u>O26:H11,H?,H-</u>	O4:H5
O68:H- O73:H34	O55:H6,H7,H10,H-	O5:H16
O75:K100:H- O86	O75:H5	O6:H1
O91:H21,H- O100:H32	O91:H21,H-	O18:H7,H-
O101:H9	O101:H-	O25:H-
O103:H2,H25,H- O105ac:H18	O103:H2	O26:H32
O110:H19	O104:H2,H-	O39:H4
O111:H2,H8,H21,H- O112ab:H21	O105ac:H18	O50:H7
O113:H21	<u>O111:H8,H-</u>	O82:H8
O114:H4	<u>O113:H21</u>	O84:H2
O117:K1:H7	O114	O111:H30,H34
O118:H12	O115:H10	O113:H7
O119:H6,H- O121	O117:H4	O114:H48
O125	O119:H6	O118:H2,H16,H30
O126:H11,H21,H27 O127	O121:H19	O121:H-
O128ab:H2,H8,H12,H25, H31,H-	O125	O125:H8,H-
O132:H-	O128ab:H2,H25,H-	O126:H8,H-
O145:H-	O145:H25,H28,H-	O146:H21
O153:H2,H11	O153:H25	O165:H
<u>O157:H7,H-</u>	<u>O157:H7,H-</u>	
O165:H25	O163:H19	
O166:H12,H15,H28	O165:H19,H25	
	O168:H-	
	OX3:H2	

Fonte: BLANCO *et al.* (1996). ^a Subscrito aparecem os sorotipos mais freqüentes. ^b Quase todos os pacientes infectados por EHEC apresentaram diarreia sanguinolenta. ^c Isolados de amostras humanas sem determinar se eram de indivíduos com diarreia, colite hemorrágica ou uremia hemolítica.

Segundo JOHNSON *et al.* (1996), o avanço de técnicas moleculares para identificar sequências gênicas *stx* e de técnicas imunológicas para detectar a expressão deste gene, leva ao reconhecimento de um aumento do número de surtos e casos esporádicos de infecção humana causada por STEC não-O157. Esses mesmos autores acreditam que a severidade das infecções causadas por STEC e o aumento do número de casos constatados mundialmente tornam as bactérias do sorogrupo O157:H7 e não-O157:H7 preocupantes com respeito à saúde pública.

3.4. Dados epidemiológicos

As EHEC O157 são a causa estimada de 73.000 doenças, 2.000 hospitalizações e 60 mortes nos EUA a cada ano (GRIFFIN *et al.*, 2000).

Em 1988 ocorreu na Bavária, Alemanha, um surto de HUS onde foram isoladas linhagens de VTEC do sorotipo O157:H- (não móvel) que fermentavam o sorbitol e exibiam atividade da β -glicuronidase. Desde então, esses microrganismos têm sido identificados como causa significativa de diarreia e HUS neste país (GUNZER *et al.*, 1992). Baseado nas características genotípicas e fenotípicas e nos padrões de eletroforese em campo de gel pulsante (PFGE) VTEC O157:H- que fermentam sorbitol (SF VTEC O157:H-) foram identificadas como um novo clone dentro do sorogrupo O157 que apresenta características de patogenicidade comuns às VTEC O157:H- que não fermentam sorbitol (NSF VTEC O157:H-).

Dois surtos de contaminação alimentar associados à transmissão de *E. coli* O157:H7 através da água foram reportados nos EUA. Um ocorreu em Missouri em 1989 e relacionou-se à algumas paradas no sistema de distribuição de água e baixa dosagem de cloro. Das 243 pessoas afetadas, um terço apresentou diarreia sanguinolenta, 32 foram hospitalizadas, 2 desenvolveram HUS e 4 morreram. O outro surto, com 80 casos, foi associado com água de recreação em um lago de Oregon em 1991. Acredita-se que a contaminação pelas fezes dos nadadores e falta de troca de água no lago tenham sido os fatores contribuintes para este surto (MOE, 1997).

Em 1991, um surto de infecção alimentar por EHEC, afetou 23 pessoas que consumiram cidra de maçã em Massachusetts. A contaminação parece ter ocorrido antes ou após colheita, pelo contato das maçãs com fezes bovina ou de veado. Desde então se considera possível o crescimento de EHEC em pH abaixo de 4,0 e sob temperatura de refrigeração de 8°C (BESSER *et al.*, 1993).

ABDUL-RAOUF *et al.* (1993), apontaram o perigo de EHEC ser capaz de crescer a 8°C, já que esta temperatura está abaixo da qual geralmente as saladas são expostas por longo período de tempo em *buffes* de restaurantes ou mesmo nos supermercados.

Este mesmo patógeno também foi responsável por um surto ocorrido em Waco, Texas em 1994 envolvendo 26 casos. Neste incidente suspeitou-se de contaminação cruzada dos ingredientes das saladas com carne bovina (BARNETT *et al.*, 1995).

Em 1995, um surto de infecção alimentar relacionado à alface contaminada com EHEC, afetou pelo menos 40 pessoas em Montana. As alfaces foram irrigadas na forma de *spray*, recebendo água na superfície e as investigações no local de compra das mesmas, revelaram métodos inadequados de manuseio. O possível mecanismo de contaminação foi apontado como sendo o método de lavagem onde alfaces picadas de diferentes origens eram imersas em uma água de lavagem comum (TAUXE *et al.*, 1997).

Um grande surto alimentar ocorrido na Austrália em 1995 evidenciou o potencial patogênico e importância na saúde pública de linhagens STEC não-O157:H7. Mais de 200 pessoas foram infectadas com STEC do sorotipo O111:H. A maioria dos pacientes apresentou diarreia aquosa ou sanguinolenta, vinte e duas crianças desenvolveram HUS e quatro adultos foram diagnosticados com púrpura trombocitopênica trombótica. Salsichas fermentadas semi-secas com menos de uma *E. coli* O111:H/10 g do produto foram relacionadas a este surto alimentar (PATON *et al.* 1996).

Em Julho de 1996, um surto afetando aproximadamente 6.000 pessoas manifestando diarreia hemorrágica e/ou síndrome hemolítica urêmica, ocorreu em Sakai, Japão. O crescimento de broto de rabanete em condições hidropônicas foi incriminado como o veículo transmissor de *E. coli* O157:H7

(World Health Organization, 1996 citado por Hara-Kudo *et al.*, 1997; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods-NACMCF, 1999). Um outro surto ocorreu no Japão em 1997 relacionado à este mesmo veículo de transmissão. Neste surto, uma mesma cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada de 126 pacientes e de brotos de rabanetes obtidos da geladeira de um dos pacientes (GUTIERREZ, 1997 e NACMCF, 1999).

A maioria dos surtos alimentares na América do Norte e no Reino Unido foi associado com o consumo de hamburger e outros produtos cárneos. Esses veículos não foram identificados em surtos alimentares na Europa Continental (KARCH *et al.*, 1999). Ao invés disso, as infecções foram relacionadas na República Tcheca ao consumo de leite cru de cabra (BIELASZEWASKA *et al.*, 1997 citado por KARCH *et al.*, 1999), na França aos queijos (DESCHENES *et al.*, 1996 citado por KARCH *et al.*, 1999), na Holanda e Finlândia à recreação em lagos abertos (CRANSBERG *et al.*, 1996 citado por KARCH *et al.*, 1999), e na Alemanha ao consumo de leite de vaca cru (BOCKEMUHL *et al.*, 1990 citado por KARCH *et al.*, 1999).

Segundo PRADO (2000), as infecções associadas às EHEC são problemas significativos de saúde pública no cone sul da América Latina. As infecções alimentares associadas às EHEC parecem ser mais frequentes na Argentina, Chile e Uruguai, onde a incidência de HUS em crianças menores do que 5 anos de idade é de 23, três e cinco/ 100.000/ano respectivamente. EHEC é responsável por aproximadamente 40% dos casos de diarreia sanguinolenta nesses países, superando os casos de *Shigella*. As estirpes isoladas com maior frequência dentre as EHEC são as não-O157 e a frequência de isolados de O157:H7 dentre os pacientes com HUS varia de 3-30% na Argentina e de 9-12% no Chile. Os maiores reservatórios identificados para EHEC no Chile foram os bovinos e suínos, com taxas de colonização de 29% e 69% respectivamente.

Um estudo realizado por CERQUEIRA *et al.* (1997) verificou uma alta frequência de *E. coli* potencialmente patogênica em produtos bovinos na cidade do Rio de Janeiro. Esses mesmos autores consideraram que a alta frequência de *E. coli* produtoras de SLT e outras *E. coli* causadoras de diarreia, por eles encontradas em produtos bovinos crus, podem representar um risco potencial para a saúde pública no Brasil.

GONZALEZ *et al.* (2000) avaliaram animais sadios, em 6 regiões geopolíticas do Estado do Rio de Janeiro, quanto a ocorrência de EHEC. Foram coletadas 539 amostras de fezes de animais, em 22 fazendas, agrupados pela idade (bezerros e adultos) e tipo de produção (animais de corte e de laticínio) que foram testadas pela técnica de reação em cadeia por polimerase (PCR) para se verificar a presença ou não de seqüências gênicas de *stx1*, *stx2* e *eae*. As amostras positivas para genes que codificam a produção da toxina Stx foram testadas para *E. coli* O157 por separação imunomagnética (IMS) e também submetidas a isolamento por hibridização das colônias. Foram verificadas a presença de seqüências gênicas de *stx* em 259 (48%) dos animais com a predominância de *stx1* (44%). Simultaneamente, observou-se a presença de *eae* genes em 98 (38%) das amostras fecais *stx*-positivas. A frequência foi levemente maior em bezerros (52%) do que em animais adultos (48%), bem como em animais de corte (49%) do que de laticínios (48%). Linhagens do sorogrupo O157 foram isoladas de 3 animais de laticínio. Foram isoladas 96 estirpes STEC, sendo 23 (24%) *eae*-positiva. Através deste estudo, foi confirmada uma larga ocorrência de STEC em bezerros no Estado do Rio de Janeiro, a presença de EHEC O157:H7 e de outras estirpes STEC *stx/eae* potencialmente patogênicas.

Os desafios para se alcançar maior segurança alimentar incluem a identificação de medidas para diminuir o transporte pelos bovinos e subsequente entrada das EHEC O157 nos abastecimentos de água e alimentos; diminuir a transmissão em sucos, alfaces e brotos, através da diminuição da transmissão pela água e melhoramento da vigilância sanitária para EHEC O157 (GRIFFIN *et al.*, 2000).

3.5. Isolamento e identificação

3.5.1. Métodos bioquímicos e imunológicos

A comparação das características de microrganismos isolados é uma prática útil para a distinção entre linhagens e também na análise epidemiológica de surtos de contaminação alimentar, ajudando nas determinações das causas e disseminação das doenças (MURASE *et al.*, 1995).

Um método clássico para a determinação de *E. coli* numa população de coliformes são as provas bioquímicas de indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e citrato, referida como IMVIC. Neste teste são consideradas como *E. coli* todas as culturas com as características de indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-); sendo que resultados + + - - designam *E. coli* tipo I; *E. coli* tipo II são - + - - (JAY, 1996).

Alguns exemplos de métodos rápidos para a contagem de coliformes e *E. coli* são o ISO-GRID HGMF (QA Life Sciences Inc.), Petrifilm Coliformes (3M) e Colilert (IDEXX Laboratories Inc.). O ISO-GRID HGMF e o Petrifilm Coliformes podem ser aplicados para amostras de alimentos em geral e o Colilert somente para amostras de água (SILVA *et al.*, 1997).

O princípio cultural do ISO-GRID HGMF é a diluição e homogeneização das amostras, seguida da filtração em filtro-membrana com grade hidrofóbica (HGMF) e transferência da membrana para ágar seletivo diferencial. O meio de cultura contém lanilina azul, que detecta lactose-positivos com viragem para azul. A contagem e o cálculo do número mais provável por grama de amostra é feita em unidades de crescimento, contam-se os quadrados azuis na grade hidrofóbica para a enumeração de coliformes totais. Para a contagem de *E. coli* a membrana precisa ser transferida para um segundo meio, contendo MUG (4-metilumbeliferil β -D-glicuronídeo), para detecção da atividade de glicuronidase (SILVA *et al.* 1997).

Mais prático de ser utilizado do que o ISO-GRID HGMF é o método que emprega as membranas de Petrifilm. Este método é composto por dois filmes estéreis, reidratáveis, impregnados pelo meio de cultura vermelho violeta bile (VRBA) com substrato cromogênico para β -glicuronidase e por substâncias geleificantes solúveis em água fria. O filme inferior é inoculado com 1 mL das diluições da amostra, coberto com o filme superior e incubado. (SILVA *et al.*, 1997).

O Colilert é muito simples e rápido, porém aprovado somente para a água. O princípio cultural deste método consiste em uma formulação pré-distribuída em frascos estéreis, que consistem de sais, fontes de carbono e nitrogênio, indicadores e nutrientes específicos para a detecção simultânea de

coliformes totais e *E. coli*. A formulação contém o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), para diferenciação dos organismos que apresentam as enzimas de fermentação da lactose (β -galactosidase) e MUG, para diferenciação de *E. coli*, que apresenta a enzima β -glicuronidase. As amostras de coliformes positivas são detectadas visualmente por desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura, sendo a presença de *E. coli* detectada pela observação de fluorescência azul sob luz UV (SILVA *et al.*, 1997).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a detecção e isolamento de *E. coli* O157:H7 em alimentos ou análise clínica. A maioria dos procedimentos tradicionalmente usados para detectar coliformes fecais e subsequentemente *E. coli*, empregam temperatura de incubação entre 44-45°C. Contudo, estudos realizados por DOYLE & SCHOENI (1984), indicaram baixo crescimento de *E. coli* O157:H7 nesta faixa de temperatura.

A enzima β -glicuronidase é a base para o desenvolvimento de testes rápidos para identificação de *E. coli* (FENG & HARTMAN, 1982). Estes testes utilizam 4-metilumbeliferil β -D-glicuronídeo (MUG) como um indicador que é hidrolisado pela ação da enzima β -glicuronidase a um produto (4-metilumbeliferona) fluorescente sob luz ultra-violeta (RIPPEY *et al.*, 1987). Esta enzima é caracteristicamente produzida por *E. coli* (96% das linhagens, incluindo linhagens anaerogênicas), mas não pelos seus acompanhantes habituais na análise de águas e alimentos (*Enterobacteriaceae*), exceto *Shigella* (44%) e *Salmonella* (29%) (SILVA *et al.*, 1997). *E. coli* O157:H7 é MUG negativa, indicando que a atividade da enzima β -glicuronidase não é fenotipicamente expressa por esses microrganismos (PADHYE & DOYLE, 1992).

Um meio seletivo diferencial que se baseia nestes princípios é o meio O157:H7-ID. Este meio contém dois substratos cromogênicos: um para a detecção de β -D-glicuronidase e um outro para a detecção de β -D-galactosidase. A diferenciação entre espécies do gênero *Escherichia* é baseada na detecção de atividades enzimáticas por esses substratos cromogênicos e no uso de carboidratos. As colônias de *E. coli* O157:H7 apresentam coloração azul esverdeada, enquanto as colônias de *E. coli* não O157:H7 apresentam coloração violeta (Manual de utilização do meio O157:H7-ID, bioMérieux,

Marcy L' Etoile).

Aproximadamente 93% das *E. coli*, isoladas de origem humana, fermentam o sorbitol dentro de 24 horas; contudo, a *E. coli* O157:H7 não o faz (WELLS *et al.*, 1983). Meios que contêm sorbitol, tais como o sorbitol-MacConkey agar (SMAC) são usados como meio diferencial para a seleção de *E. coli* O157:H7 de outras bactérias entéricas (KLEANTHOUS *et al.*, 1988). Contudo, mais de 5% dos isolados clínicos, incluindo *Escherichia hermannii* e algumas linhagens de *E. coli* O157:H16, são sorbitol negativos (BORCZYK *et al.*, 1989). Portanto, a averiguação de linhagens sorbitol-negativas para a caracterização de *E. coli* O157:H7 pode levar a resultados falsos.

A seletividade do meio SMAC foi melhorada pela suplementação com cefixima e telurito de potássio para compor o meio cefixima-telurito-SMAC (CT-SMAC), que inibe largamente a biota fisiológica (ZADIK *et al.* 1993). Contudo, linhagens de STEC O157:H-, sorbitol-positivas, são sensíveis a alta concentração de telurito e não crescem neste meio (KARCH *et al.*, 1996 citado por KARCH *et al.*, 1999).

A partir de colônias sorbitol-negativas, deve-se proceder a confirmação de *E. coli* O157 através de teste de aglutinação com o antissoro específico. Este mesmo procedimento é usado para identificar-se linhagens sorbitol-positivas O157:H-. Os isolados de *E. coli* O157 devem ser posteriormente testados quanto a produção de Stx pelo teste de citotoxicidade em células Vero (KARMALI *et al.*, 1985) e/ou presença de genes *stx* pelo procedimento do PCR (Reação em Cadeia por Polimerase) (KARCH & MEYER, 1989).

Como o número de microrganismos *E. coli* O157:H7 nas fezes pode ser extremamente baixo e portanto indetectável por plaqueamento direto em meio SMAC ou CT-SMAC, meios seletivos de enriquecimento de amostras fecais têm demonstrado aumentar a taxa de isolamento deste patógeno. Um procedimento extremamente útil para enriquecimento seletivo de *E. coli* O157:H7 em fezes humanas é a técnica de separação imunomagnética (IMS) (WRIGHT *et al.*, 1994). Nesta técnica as amostras fecais são pré-enriquecidas por várias horas em meio tampão peptonado com ou sem antibióticos e então incubadas com contas magnéticas (Dynabeads; Dynal, Oslo, Noruega) recobertas com anticorpo anti-O157. As contas que se ligam às bactérias são

posteriormente separadas por força magnética e plaqueadas em meio SMAC ou CT-SMAC (KARCH *et al.*, 1996 citado por KARCH *et al.*, 1999).

Kits de ELISA (ensaio imunoabsorvente por ligação enzimática) são comercialmente disponíveis para rastreamento rápido do antígeno O157 em amostras fecais, sendo sua sensibilidade comparável ao do meio SMAC (MACKENZIE *et al.* 1998). Esse método tem a vantagem de detectar tanto linhagens de *E. coli* O157:H7/H- sorbitol-negativas, bem como linhagens O157:H-, sorbitol-positivas (BIELASZEWSKA *et al.*, 1998 citado por KARCH *et al.*, 1999).

HALDANE *et al.* (1986), descreveram marcadores bioquímicos suplementares tais como a descarboxilação da ornitina e lisina em conjunto com sorbitol o que aumentou a especificidade da triagem para *E. coli* O157:H7 baseada somente na fermentação do sorbitol. Esses mesmos pesquisadores sugeriram que uma triagem sorbitol-lisina-ornitina seria particularmente importante para os pequenos laboratórios que não realizam sorologia.

Um teste rápido de aglutinação em látex (*E. coli* O157 latex test, Oxoid, Ltd., Hampshire, England) é comercialmente disponível para detecções presuntivas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O157. Porém, BORCZYK *et al.* (1990), demonstraram que este teste pode estar sujeito a resultados falso-positivos para aquelas *Escherichia* sorbitol-negativas, incluindo *E. hermannii*, *E. coli* O148:NM e *E. coli* O117:H27.

OKREND *et al.* (1990), descreveram um procedimento para detecção de *E. coli* O157:H7 a partir de carne bovina. O procedimento utilizou uma tela onde pela realização do teste de ELISA detectou-se antígenos de O157:H7. Este método envolveu inoculação das amostras em caldo de enriquecimento EC modificado, incubação sob agitação a 37°C por 6-8 horas e inoculação das diluições em placa de contagem 3M Petrifilm™ *E. coli*. As placas foram incubadas a 42°C por 18 horas e as colônias foram replaqueadas (tela negativa *E. coli* O157:H7) por contato de 2 minutos entre as telas. As colônias crescidas foram então testadas para a presença do antígeno O157 através de um ensaio imunoenzimático empregando antissoro contra *E. coli* O157. As colônias que reagiram com antissoro *E. coli* O157 foram isoladas tanto do meio de enriquecimento como diretamente das telas de Petrifilm e repicadas em meios

seletivos diferenciais como SMAC (ágar MacConkey sorbitol) e SMAC suplementado com BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glicuronídeo). Este é um método rápido que permite identificação presuntiva de *E. coli* O157:H7 dentro de 26-28 horas. O procedimento tem sensibilidade mínima de 0,6 *E. coli* O157:H7 por grama de alimento, com 0% de resultados falso negativos e 2% falso positivos. Como o procedimento emprega antissoro O157 policlonal, deve-se fazer a confirmação para *E. coli* O157:H7 com todas as amostras positivas por isolamento do microrganismo; o que implica em mais 3-4 dias de trabalho.

Um método alternativo de rastreamento para isolamento tanto de linhagens STEC O157 como de não-O157 é o ágar de enterohemolisina. O método é baseado no conhecimento de que uma porção significativa de isolados de STEC não-O157 bem como quase todos os isolados de STEC O157 exibem um fenótipo enterohemolítico característico em ágar sangue contendo eritrócitos de cabra lavados e íons de cálcio (BEUTIN *et al.*, 1989). A estreita zona de turbidez que detecta a ocorrência da hemolisina é evidente após 18-24 h de incubação a 37°C. LEHMACHER *et al.* (1998), sugeriram suplementação com antibióticos (ágar sangue vancomicina-cefixima-cefsulodina) para aumentar a seletividade do ágar de enterohemolisina.

3.5.2. Métodos moleculares

Nos estudos epidemiológicos de contaminação alimentar há necessidade de se empregar métodos eficientes e de confiança para a caracterização de isolados de um mesmo sorovar (JAY, 1996).

Os isolados de STEC devem ser caracterizados e subtipados utilizando-se métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos são definidos pelas propriedades que são expressadas pelos genes, como o sorotipo (BOCKEMUHL *et al.*, 1992), o fagotipo O157 (KHAKHRIA *et al.*, 1990), o padrão de resistência a antibiótico (KIM *et al.*, 1994), o fenótipo de produção de shiga toxina (HII *et al.*, 1991), e a presença de fatores de virulência putativos (fenótipo enterohemolítico e propriedades de *attaching/effacing*). Os métodos genotípicos usam características moleculares específicas do

cromossomo, DNA plasmidial ou do fago e determinação dos genes de virulência (KARCH *et al.* 1999).

Durante as últimas décadas foram realizados vários estudos sobre o mecanismo de patogenicidade da *E. coli*. Os dados genéticos encontrados indicaram que de 10 a 20% da informação genômica verificada nas *E. coli* patogênicas não está presente na *E. coli* K-12, uma linhagem não patogênica largamente utilizada em pesquisas científicas. Muitos dos genes adicionais encontrados em *E. coli* patogênicas codificam vários fatores de virulência. Métodos de diagnóstico usados atualmente baseiam-se na detecção de toxinas específicas e seus atributos de virulência ou em genes específicos que permitem a identificação do tipo patogênico (KUHNERT *et al.*, 2000).

Um procedimento bastante empregado para análise molecular de DNA de patógenos é a Reação em Cadeia por Polimerase (PCR). Este método tem o potencial de detectar espécies microbianas pela amplificação de seqüências genéticas únicas no microrganismo (SAIKI *et al.*, 1987). Muitas técnicas baseadas em PCR foram desenvolvidas para identificação de microrganismos patogênicos presentes em alimentos, tais como: *Shigella flexneri* (LAMPEL *et al.*, 1990 e RAFIL *et al.*, 1995), *E. coli* (WERNARS *et al.*, 1991) *Vibrio cholerae* (KOCH *et al.*, 1993), e *E. coli* O157 (POLLARD *et al.*, 1990 e JINNEMAN *et al.*, 1995), dentre outros.

A técnica do PCR foi criada por Kary Mullis da Cooperação Cetus em 1983 e é atualmente uma técnica muito utilizada em microbiologia molecular, com aplicações diretas na pesquisa de genética, diagnoses médicos e ciência forense (KENDREW, 1994).

PCR é uma técnica de amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA. Começando com pequena quantidade de uma seqüência de ácidos nucleicos de qualquer origem, o PCR gera enzimaticamente milhões ou mesmo bilhões de cópias exatas (KENDREW, 1994).

A técnica do PCR requer que a seqüência de nucleotídeos de uma determinada porção do gene desejado, gene alvo, seja conhecida. Isto é necessário porque pequenos *primers*, oligonucleotídeos complementares à

seqüência do gene de interesse, são necessários para a realização desta técnica (BROCK *et al.*, 1994).

A amplificação do DNA ocorre através dos seguintes passos: 1) Dois *primers* que flanqueiam o DNA alvo são produzidos em um sintetizador de oligonucleotídeos e acrescentados em excesso ao DNA desnaturado por aquecimento; 2) Com o resfriamento da mistura, o excesso de *primers* referentes ao DNA alvo assegura que a maioria das seqüências alvo vão se anelar ao *primer* e não uma com as outras e 3) A enzima DNA polimerase é então acrescentada e estende o *primer* usando a seqüência alvo como molde.

Após um período apropriado de incubação, a mistura é aquecida novamente para desnaturação do DNA molde. A mistura é então resfriada para permitir a hibridização dos *primers* às regiões complementares dos DNAs recém sintetizados e todo o processo é repetido (BROCK *et al.*, 1994).

Assim, cada ciclo envolve: 1) Aquecimento próximo à temperatura de ebulição para desnaturação do DNA molde (94°C); 2) Resfriamento para permitir o anelamento dos *primers* às seqüências do DNA molde (34°C) e 3) Aquecimento moderado permitindo a extensão dos *primers* anelados pela ação da enzima DNA polimerase termoestável duplicando o DNA alvo (45-72 °C) e 4) Desnaturação, por aquecimento a 95°C, dos duplexes recém formados retornando então à primeira etapa do ciclo (BROCK *et al.*, 1994).

Um ciclo tem duração de 3 - 5 minutos e é repetido de 25 - 40 vezes. Assim, cada ciclo dobra o número de moléculas de DNA alvo, já que cada segmento novo sintetizado servirá como DNA molde no ciclo seguinte. Com este crescimento logarítmico do produto, ao final de 20 ciclos, teoricamente, resultaria em um milhão de vezes de amplificação de um fragmento de DNA cujo comprimento é definido pelo final 5' do *primer*. Na prática contudo, a eficiência da reação de amplificação é inversamente proporcional ao comprimento do segmento amplificado (KENDREW, 1994).

O descobrimento de uma DNA polimerase termoresistente (Taq polimerase), estável a 95°C, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* e a automatização do procedimento para PCR, facilitaram enormemente a introdução deste método em diagnósticos laboratoriais e conduziram a um

aumento exponencial do número de aplicações de PCR (VAN BELKUM, 1994).

A técnica do PCR é o método molecular mais amplamente utilizado para detectar-se genes que codificam a produção de shiga toxina em rastreamento de amostras clínicas da STEC não-O157:H7.

A presença de genes que codificam as Stx (genes Stx) podem ser detectadas utilizando-se dois protocolos diferentes. No primeiro, utiliza-se um unico par de primers para amplificar a porção do gene que codificam as subunidades A da Stx1, Stx2 e variantes da Stx2 (KARCH & MEYER, 1989). Esse protocolo permite a detecção de todos os genotipos de Stx em uma única reação. Neste caso a discriminação dentre os genes Stx é feita através da subsequente hibridização dos produtos amplificados com sondas específicas de nucleotídeos para cada gene Stx (KARCH *et al.*, 1999). No segundo, utilizam-se pares de primers específicos para cada um dos genes que codificam as Stx1, Stx2 e variantes da Stx2. Os diferentes pares de primers podem ser utilizados individualmente ou combinados na mesma reação de PCR. Neste ultimo procedimento, os produtos da ampliação de diferentes genes Stx, que diferem em tamanho, são posteriormente distinguidos por eletroforese em gel de agarose (RUSSMANN *et al.*, 1994).

POLLARD *et al.* (1990), verificaram que a técnica de PCR, detecta os genes que codificam a verotoxina com uma sensibilidade de 1 ng do total de ácidos nucléicos e apontaram esta técnica como sensível e específica, passível de ser empregada com eficácia em testes rápidos para triagem de *E. coli* produtoras de verotoxinas.

A técnica do PCR pode ser realizada com lisados brutos, extratos de DNA de uma única colônia, culturas de fezes ou diretamente a partir de extrato de fezes (KARCH *et al.*, 1996 citado por KARCH *et al.*, 1999).

Embora a técnica do PCR seja muito útil para o rastreamento de um grande número de amostras, a falta de equipamentos apropriados e de *primers* comercialmente viáveis correntemente impedem a aplicação rotineira deste método em laboratórios de diagnóstico (KARCH *et al.* 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Foram coletadas amostras de alfaces e de suas águas brutas de irrigação em 9 hortas na região de Campinas. Em 2 hortas foram coletadas 10 amostras de água de irrigação e 10 amostras de alfaces/horta; nas outras 7 hortas foram coletadas 1 amostra de água de irrigação e 2 amostras de alface/horta. A numeração das hortas, suas localizações e/ou nomes e os números de amostragem por horta podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Numeração das hortas, suas localizações e/ou nomes e os números de amostras de águas e alfaces por horta.

Numeração das hortas	Localização e/ou nome das hortas	N ^{os} . de amostras de águas	N ^{os} . de amostras de alfaces
1	Três Marias	10	10
2	Santa Rosa (Rua Aguapé, 523)	10	10
3	Santa Genebra	1	2
4	Santa Genebra	1	2
5	São Pedro (Monte Mor)	1	2
6	São Cristovão (Monte Mor)	1	2
7	Santa Genebra	1	2
8	Sousas	1	2
9	Barão Geraldo (Guará)	1	2
Total		27	34

Neste estudo, escolheu-se o alface como amostra de vegetal devido aos vários casos de infecção alimentar reportados e ao grande consumo *per capita* deste alimento (LITTLE, *et al.* 1999).

As amostragens na horta de número 1 (Três Marias) foram realizadas em 3 etapas (27/02/1999, 7/03/1999 e 14/03/1999) sendo que na primeira e segunda foram amostradas 3 unidades de água de irrigação e 3 de alface, enquanto na terceira etapa foram amostradas 4 unidades de água de irrigação e 4 de alface.

As amostragens na horta de número 2 (Santa Rosa) foram realizadas em 2 etapas (21/03/1999 e 1/04/1999) sendo que em cada uma delas foram amostradas 5 unidades de água de irrigação e 5 de alface.

As amostragens nas hortas de números 3 e 4 foram realizadas em 27/07/1999, as amostragens nas hortas de números 5 e 6 foram realizadas em 28/07/1999 e as amostragens nas hortas de números 7, 8 e 9 foram realizadas respectivamente em 28/07/1999, 30/07/1999 e 1/08/1999.

As amostras de águas e alfaces foram coletadas respectivamente em frascos de vidros estéreis e sacos plásticos. Ambas as amostras foram transportadas para o laboratório refrigeradas em caixas de isopor e as análises iniciadas de imediato.

4.2. Enumeração e isolamento

Nas 2 hortas em que foram coletadas 10 amostras de água de irrigação e 10 de alface/horta, procedeu-se à enumeração de coliformes totais, fecais e *E. coli* utilizando-se Petrifilm para contagem de *E. coli* e coliformes - Petrifilm EC (3M do Brasil Ltda.) e a Técnica do Número Mais Provável (NMP). A Figura 1 apresenta os testes realizados com as amostras de água de irrigação e alface das hortas 1 e 2.

Para o isolamento de *E. coli* a partir das alfaces, 25 g destas foram lavadas assepticamente por agitação com 225mL de solução salina peptonada estéril. A seguir procedeu-se com a água de lavagem das alfaces as mesmas análises das águas de irrigação, empregando-se a técnica de Petrifilm EC e a dos tubos múltiplos.

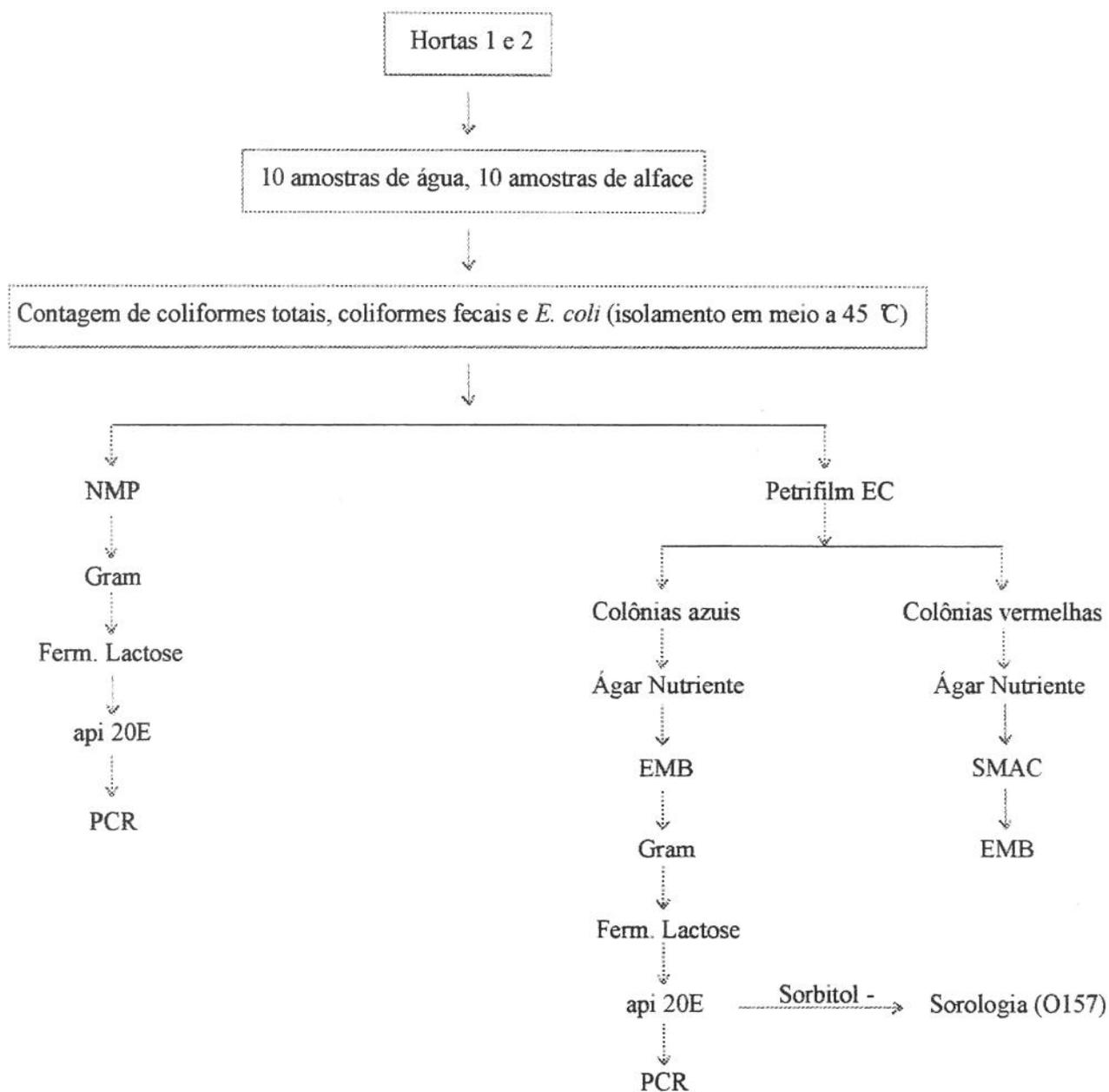


Figura 1. Fluxograma dos testes realizados com as amostras de água e alface de duas hortas na região de Campinas, S.P.

4.2.1. Petrifilm EC

Inoculou-se o filme inferior da placa Petrifilm EC com 1mL de 3 diluições decimais da amostra, cobriu-se com o filme superior sendo o inóculo espalhado imediatamente por leve pressão manual, com um espalhador apropriado que acompanha o Kit; a seguir, as placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Após incubação, as colônias vermelhas com bolhas de gás e as azuis também com bolhas de gás presentes na placa, foram enumeradas respectivamente como coliformes e *E. coli*. A quantificação dos coliformes totais deu-se pela somatória das colônias vermelhas e azuis com gás.

De cada tela de Petrifilm EC isolou-se as colônias típicas de *E. coli* (azuis com produção de gás) que foram transferidas para Nutriente Ágar (NA) e a seguir purificadas por estrias em superfície no meio Eosina Ágar Azul de Metileno (EMB). As culturas purificadas foram submetidas à coloração de Gram e caracterização bioquímica e molecular.

4.2.2. Técnica do Número Mais Provável (NMP)

Para teste presuntivo de coliformes, foram realizadas três diluições decimais sucessivas de cada amostra, e adicionou-se 1,0 mL de cada diluição à séries de 5 tubos contendo 10,0 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Os tubos de LST foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ e observados quanto a produção de gás. Em caso positivo (crescimento e produção de gás) foram realizados testes confirmativos para coliformes fecais e teste confirmativo para coliformes totais. Em caso negativo (crescimento e/ou produção de gás) os tubos foram reincubados até completar 48 h e repetiu-se a leitura passando para teste confirmativo nos casos em que houve crescimento com produção de gás.

Para o teste confirmativo de coliformes totais, de cada tubo de caldo LST com crescimento e produção de gás, transferiu-se uma alçada da suspensão para tubos contendo 9,0mL de Caldo Verde Brilhante (VB). Os tubos foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}/24-48\text{ h}$ anotando os tubos com crescimento e produção de gás.

Para o teste confirmativo de coliformes fecais, de cada tubo de caldo LST, transferiu-se uma alçada da suspensão para tubos contendo 9,0 mL de caldo *E. coli* (caldo EC). Os tubos foram incubados em banho-maria a $44,5 \pm 0,1^\circ\text{C}/24$ h e observou-se o crescimento com produção de gás. A incubação dos tubos de EC foi sempre acompanhada de um tubo inoculado com uma cepa padrão de *E. coli* e de um outro inoculado com uma linhagem padrão de *Enterobacter aerogenes*. Nas condições de incubação apenas a cepa de *E. coli* produz gás. Qualquer alteração na temperatura do banho-maria pode ser evidenciada pelo comportamento das linhagens padrão.

De cada tubo com caldo EC com produção de gás em 24 h, foi estriada uma alçada da cultura em placas com meio Eosina Ágar Azul de Metileno (EMB). As placas foram incubadas a $35^\circ\text{C}/24$ h, e observou-se se houve crescimento de colônias típicas de *E. coli* (nucleadas com centro preto com ou sem brilho verde metálico). A partir das placas com colônias típicas, transferiu-se duas colônias bem isoladas de cada placa, para tubos inclinados de Ágar Padrão para Contagem (PCA). Após crescimento das culturas a $35^\circ\text{C}/24$ h, adicionou-se óleo mineral estéril e estocou-se as culturas sob refrigeração a 16°C .

A partir das culturas puras em PCA, realizou-se a técnica de coloração de Gram e provas de caracterização bioquímica e molecular.

4.2.3. Isolamento de *E. coli* O157:H7

As tentativas de isolamento de possíveis linhagens de *E. coli* O157:H7 foram realizadas através das placas de Petrifilm EC utilizadas para a contagem de coliformes totais e *E. coli* e a partir de amostras de água e alface provenientes de 7 hortas da região de Campinas.

Nas placas de Petrifilm as colônias de *E. coli* O157:H7, não são diferenciadas das colônias de coliformes pois ambas são β - glicuronidase negativas e formam colônias vermelhas. Portanto, para o isolamento de possíveis linhagens de *E. coli* O157:H7, isolou-se até 10 colônias vermelhas escolhidas aleatoriamente nas placas de Petrifilm EC que apresentaram a

diluição mais apropriada, ou seja, a diluição onde as colônias não estavam aglomeradas, sendo assim viável o isolamento com a alça de platina. As colônias foram inoculadas separadamente em tubos com ágar nutriente e incubadas a 35°C/24 h. Em seguida, as culturas foram estriadas em superfície em placas com meio Sorbitol MacConkey Ágar (SMAC) e incubadas a 35°C/24 h. Após incubação as colônias sorbitol-negativas foram estriadas em superfície em meio EMB e incubadas a 35°C/24 h para confirmação de *E. coli*.

Foram também realizadas tentativas de isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de amostras de águas (1 amostra/horta) e alfaces (2 amostras/horta) provenientes de 7 hortas da região de Campinas. A Figura 2 apresenta um fluxograma dos testes realizados com essas amostras.

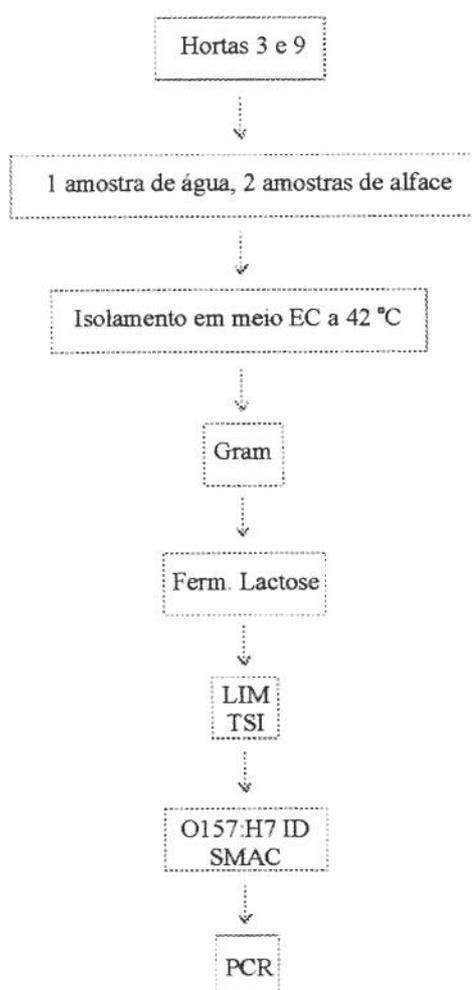


Figura 2. Fluxograma dos testes realizados com as amostras de água de irrigação e alface de sete hortas na região de Campinas, S.P.

De cada unidade de amostra de água e de alface, respectivamente 25 mL e 25 gramas, foram incubados em 225 mL de caldo LST a 35°C/24 h. Posteriormente, transferiu-se 1 mL para 3 tubos com 9 mL de caldo EC e incubou-se em banho-maria a 42°C/24 h. A partir dos tubos de EC com crescimento e produção de gás, estriou-se uma alçada da cultura em placas de EMB. De cada placa com colônias típicas de *E. coli*, transferiu-se uma colônia isolada para tubo contendo PCA para posterior confirmação de *E. coli* O157:H7 nos meios seletivos diferenciais SMAC e O157:H7 ID (bioMérieux, Marcy L' étoile, França).

4.3. Caracterização das culturas puras

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Veterinária da Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tóquio, Japão, sob orientação do Dr. Ken-ichi Kaneko.

4.3.1. Purificação e armazenamento

Verificou-se a pureza das culturas isoladas através de estrias em superfície em placas contendo TSA. Após purificação das culturas que apresentaram contaminantes, todas foram armazenadas em meio estoque (Difco, Detroit, EUA) a 10°C.

4.3.2. Coloração de Gram

Realizou-se a técnica da coloração de Gram com todas as culturas puras isoladas de alface e de suas águas de irrigação. Cada coloração foi acompanhada de um parâmetro para resultado Gram-positivo com cultura de *S. aureus* e de um parâmetro para resultado Gram-negativo com cultura de *E. coli*.

4.3.3. Fermentação da lactose

Todas as culturas isoladas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo lactose (Difco, Detroit, EUA) e tubos de Durham. Incubou-se os tubos de ensaio a 37°C/24-48 horas e observou-se o crescimento e produção de gás.

4.3.4. Galeria bioquímica api 20E

A confirmação de *E. coli* e verificação dos perfis bioquímicos das culturas puras isoladas pela técnica dos tubos múltiplos ou Petrifilm EC foi realizada através da galeria bioquímica api 20E (bioMérieux, Marcy L'Étoile, França). Os teste foram realizados segundo as recomendações do fabricante.

4.3.5. Sorologia

As culturas puras que não fermentaram o sorbitol na galeria api 20E foram testadas contra antissoro específico para *E. coli* O157 (Denka Seiken Co., Ltd. Tóquio, Japão).

Realizou-se o teste sorológico homogeneizando-se uma gota do antissoro O157 com uma alçada das culturas puras sobre uma lâmina de vidro. Em seguida, observou-se se houve reação de aglutinação ou não entre o antissoro O157 e o antígeno (cultura pura isolada).

4.3.6. Testes em meio TSI e LIM

Realizou-se os testes de crescimento em meio ágar tríplice açúcar (TSI) (Nissui Co., Ltd., Tóquio, Japão) e lisina, indol, motilidade (LIM) (Nissui Co., Ltd., Tóquio, Japão) para a confirmação de *E. coli* das culturas puras isoladas em EC a 42°C (item 4.2.3.).

As culturas puras isoladas foram inoculadas em superfície inclinada e por picada em profundidade em tubos de ensaio com o meio TSI e por picada

em profundidade em tubos de ensaio com o meio LIM e incubadas a 37°C/24 h. Após incubação observou-se a utilização dos açúcares glicose, sacarose e lactose, a produção de H₂S e formação de CO₂ e H₂ no meio TSI. No meio LIM observou-se a motilidade, descarboxilação da lisina e produção de indol.

4.3.7. Testes em meio O157:H7 ID e SMAC

Todas as culturas puras isoladas em LST com posterior crescimento e produção de gás em EC quando incubadas a 42°C foram estriadas por esgotamento em superfície nos meios seletivos/diferenciais O157:H7 ID (bioMérieux, Marcy L'etoile-França) e SMAC- Sorbitol MacConkey Ágar (Eiken Chemical Co., Ltda. Osaka-Japão). As placas de Petri foram incubadas a 37°C/24 h. Após incubação, observou-se a característica fenotípica de coloração das colônias em ambos os meios.

4.3.8. Caracterização molecular

Os isolados que tiveram a confirmação positiva de *E. coli* através da galeria api 20E ou dos testes TSI/LIM foram submetidos à técnica de Reação em Cadeia por Polimerase (PCR) para verificar a presença de genes que codificam a produção de verotoxinas.

4.3.8.1. Extração dos DNAs

Os isolados foram estriados em superfície em placas com ágar tripticase de soja (TSA) e incubados por uma noite a 37°C. Transferiu-se uma colônia isolada de cada placa para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio caldo lactose (LB broth, Miller Difco laboratories) e incubou-se por uma noite a 37°C. Posteriormente 1,8mL de caldo lactose de cada tubo, foram transferidos para tubos de centrifugação (Eppendorf) e centrifugados a 15000 rpm/5min (Tomy MC-15A). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o **pelete** homogeneizado levemente em agitador com rotação fraca com 200 µL de TES (Tris EDTA Salina). Acrescentou-se 20 µL de SDS (Sódio Dodecil Sulfato) a 10%, homogeneizou-se novamente em agitador com rotação fraca e

incubou-se os tubos de Eppendorf em banho-maria a 55°C/60min. A seguir, acrescentou-se em cada tubo 10µL de Rnase na concentração de 20 mg/mL e incubou-se em banho-maria por 37°C/15min.

Após a incubação em banho-maria, acrescentou-se em cada tubo de Eppendorf, 600µL de solução fenol-clorofórmio-isoamilálcool (25:24:1v/v), homogeneizou-se invertendo o tubo e centrifugou-se a 15000 rpm/10min. Retirou-se, com auxílio de pipeta com ponteiras estéreis, o sobrenadante contendo os DNAs e transferiu-se para novo tubo de Eppendorf. Após repetir-se 3 vezes a extração com a solução fenol-cloroformio-isoamilálcool, acrescentou-se 1 mL de etanol 99,5 vol.% (Wako Co., Ltd., Tóquio, Japão), centrifugou-se a 15000 rpm/ 10 min, desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 58 µL de TE (tampão Tris-EDTA pH 8,0).

4.3.8.2. Amplificação dos DNAs

A amplificação dos DNAs foi realizada utilizando-se um par de *primers* (sentido *sense* e não *sense*) genérico (produzido sob encomenda pela espec-oligo Co., Ltd., Tóquio, Japão) capaz de detectar os diferentes genes que codificam as verotoxinas. O *primer* no sentido *sense* possuía as seqüências de bases GAACGAAATAATTTATATGT e o *primer* não *sense* as seqüências TTTGATTGTTACAGTCAT. Os *primers* utilizados neste estudo permitem a amplificação dos genes que codificam shigatoxinas VT1, VT2 e as variantes VT2vha, VT2vhb, VT2vp1 e VT2vp2.

Cada 1µL de DNA extraído dos isolados de *E. coli* foi homogeneizado em uma solução (mistura para PCR) de volume final de 50 µL composta de 29,75µL de água deionizada estéril, 5µL de tampão reagente 10X, 4 µL de dnTP-deoxinucleotideo trifosfato (contendo dATP, dCTP, dTTP e dGTP na quantidade de 2,5 mM), 5µL de *primer* no sentido *sense* (5 µM), 5 µL de *primer* no sentido não *sense* (5µM) e 0,25 µL de Taq polimerase (1,25 U). Todos os componentes utilizados na mistura para PCR foram produzidos pela Sawady Technology Co., Ltd., Tóquio, Japão.

A amplificação dos DNAs foi realizada no ciclador térmico Sistema de Programa de Controle de Temperatura PC-700 (ASTEC Co., Ltd., Tóquio,

Japão) programado para realizar 40 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto e meio de anelamento a 43°C e um minuto e meio de extensão a 72°C.

A amplificação dos DNAs foi sempre acompanhada de um controle positivo (DNA extraído de uma linhagem de *E. coli* O157:H7) e um controle negativo (mistura para PCR).

4.3.8.3. Eletroforese e coloração do gel

Realizou-se a eletroforese em gel de ágar (Iwai Chemicals Co., Tóquio, Japão) a 1,5% por 60 minutos a 50 volts e 30 mA (Minigel Eletroforese System Mupid-2). Após coloração com brometo de etila a 0,1% fez-se a visualização das bandas de DNA sob luz ultravioleta (254nm).

Como referência do peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados, utilizou-se o marcador de DNA de 1 Kb (0,1 µg/µL) da Gibco BRL, NY, EUA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Enumeração e isolamento

5.1.1. Petrifilm EC

Nas hortas de número 1 e 2, onde foram coletadas 10 amostras de água de irrigação e 10 de alface/horta, procedeu-se à enumeração de coliformes e *E. coli* utilizando-se Petrifilm para contagem de *E. coli* e coliformes - Petrifilm EC (3M do Brasil Ltda.) e a técnica do Número Mais Provável (NMP).

Nas placas de Petrifilm EC as colônias azuis associadas à bolhas de gás foram consideradas colônias confirmadas de *E. coli*, coliformes não-*E. coli* foram visualizadas como colônias vermelhas associadas à bolhas de gás. A somatória de todas as colônias vermelhas ou azuis associadas à bolhas de gás forneceu o resultado da contagem total de coliformes.

A Tabela 4 mostra os resultados da contagem de coliformes totais através da técnica do Petrifilm EC em 10 amostras de água de irrigação e alface em 2 hortas na região de Campinas.

Tabela 4. Contagem de coliformes totais através do Petrifilm EC em 10 amostras de água de irrigação e 10 amostras de alface em 2 hortas na região de Campinas.

N° de amostras	N° de coliformes totais/mL ou g			
	amostras de água		amostras de alface	
	Horta 1	Horta 2	Horta 1	Horta 2
1	800	120	$2,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
2	700	120	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
3	200	100	$1,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
4	600	60	0	$4,0 \times 10^4$
5	100	70	0	$2,0 \times 10^4$
6	400	5	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$
7	30	11	$3,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$
8	30	7	$1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
9	70	7	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
10	40	6	$4,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$

Poucas placas Petrifilm EC apresentaram colônias típicas de *E. coli* (azuis associadas à bolhas de gás) em diluições viáveis para contagem (15-150 colônias/placa). Geralmente essas colônias foram visualizadas em placas onde o número de colônias era muito elevado dificultando o isolamento de *E. coli*.

Foram isoladas todas as colônias azuis associadas à bolhas de gás, independentemente da diluição das amostras nas placas Petrifilm EC. Isolou-se um total de 32 colônias típicas de *E. coli*, 24 provenientes de amostras de água bruta de irrigação e 8 de amostras de água de lavagem de alface.

As placas de Petrifilm EC das amostras sem diluição (S/D), 10^{-1} e 10^{-2} proporcionaram o isolamento de colônias provenientes de amostras de água, enquanto que as diluições 10^{-3} e 10^{-4} mostraram-se mais adequadas para o isolamento de colônias provenientes de amostras de alface.

As placas de Petrifilm EC mostraram-se satisfatórias como um método auxiliar para isolamento mas não para contagem.

A 3M não tem documentação sobre o uso das placas Petrifilm EC para outras indústrias além das do setor alimentício. Por, exemplo, a 3M não tem documentação sobre o uso de placas Petrifilm EC para a análise de água (Manual de Utilização do Petrifilm EC, 3M).

5.1.2. Técnica do Número Mais Provável (NMP)

Realizou-se a enumeração de coliformes totais, coliformes fecais, e *E. coli* através da técnica do NMP com as 20 amostras de água de irrigação e 20 amostras de alface coletadas nas hortas 1 e 2.

De acordo com a resolução da CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 20, de 10 de junho de 1986, são estabelecidos os seguintes limites e/ou condições para as águas doces destinadas à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas: não devem ser poluídas por excrementos humanos, ressaltando-se a necessidade de inspeções sanitárias periódicas. Não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes fecais/100

mL. No caso de não haver meios disponíveis para o exame de coliformes fecais, o índice limite será de 1000 coliformes totais/100 mL.

Tomando-se como base esses valores, das 10 amostras de água de irrigação da horta 1, 8 apresentaram NMP de coliformes totais (CT) superior (17 – 490) ao valor máximo recomendado, sendo que a média foi de 171 bactérias/mL, número 17 vezes maior do que o recomendado (Anexo 1). O NMP para coliformes fecais (CF) variou de 4 – 49 bactérias/mL, valor superior ao recomendado, com exceção de apenas uma amostra onde observou-se valor menor do que 2 bactérias/mL (Anexo 2). Os valores observados para a enumeração presuntiva de *E. coli* variaram de 4-23 bactérias/mL com exceção de 3 amostras que apresentaram valores menores ou iguais a 2 bactérias/mL (Anexo 3).

Na horta 2, a média do NMP de CT em 10 amostras de água de irrigação foi de aproximadamente 25 bactérias/mL, valor superior ao recomendado. Metade das amostras apresentou valores de CT superiores ao recomendado (22 – 79/mL). Na outra metade das amostras, observou-se valores de CT que variaram de 0,9 – 4,9/mL (Anexo 4). Nesta mesma horta, a média do NMP de CF em 10 amostras de água de irrigação foi de 2,6 bactérias/mL, sendo que 4 amostras apresentaram enumeração inferior (0,5 – 1,7 bactérias/mL) ao limite máximo recomendado. O maior número de CF nesta horta foi de 4,9 bactérias/mL (Anexo 5). Os valores observados para a enumeração presuntiva de *E. coli* variaram de 0,2-2,3 bactérias/mL (Anexo 6).

De acordo com os padrões para amostras de vegetais frescos no ponto de venda estabelecidos pelas normas de procedimento microbiológico da Public Health Laboratory Service - PHLS (LITTLE *et al.*, 1999), o número de *E. coli* expresso por unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) < 20 é considerado satisfatório, 20-<10² está dentro do limite de aceitabilidade, 10-<10⁴ é insatisfatório e ≥10⁴ é inaceitável e considerado potencialmente perigoso.

Na horta 1, a média do NMP de CT verificados em 10 amostras de alface foi de aproximadamente 6,0x10³ bactérias/g, sendo que os valores variaram de 33 – 3,3x10⁴ bactérias/g (Anexo 7). Os valores obtidos para CF variaram de <2-79 bactérias/g, sendo que 7 amostras apresentaram valor menor ou igual a 2 bactérias/g (Anexo 8). Os valores observados para a enumeração presuntiva de *E. coli* nessas mesmas amostras (Anexo 9) variaram de <2-79 bactérias/g, sendo que 8 amostras apresentaram valor

menor ou igual a 2 bactérias/g, valor considerado satisfatório pelos padrões da PHLS para número de *E. coli* em vegetais frescos no ponto de venda.

Na horta 2, a média do NMP de CT verificados em 10 amostras de alface foi de aproximadamente $3,3 \times 10^3$ sendo que os valores observados variaram de 460 – $1,7 \times 10^4$ (Anexo 10). A média do NMP de CF foi de aproximadamente 800 bactérias/g, sendo que três amostras apresentaram 2 bactérias/g e seis amostras apresentaram valores que variaram de 5 – 50 bactérias/g. O valor elevado da média do NMP de CF nessas amostras deve-se ao fato de que em uma amostra obteve-se $7,9 \times 10^3$ bactérias/g (Anexo 11). Os valores observados para a enumeração presuntiva de *E. coli* nessas mesmas amostras variaram de $< 2-7,9 \times 10^3$, sendo que somente uma amostra apresentou valor superior a 20 bactérias/g (Anexo 12). Portanto, a maioria dessas amostras apresentaram valores satisfatórios para a determinação presuntiva de *E. coli* pelos padrões da PHLS para alfaces no ponto de venda.

Organismos indicadores são globalmente usados como advertência de possível contaminação e como um índice da qualidade de água. As bactérias do grupo coliforme têm sido usadas com confiança para se determinar a segurança de águas potáveis. Coliformes e outros organismos também são usados para sinalizar as condições sanitárias em águas recreacionais que possam levar à conseqüências de saúde adversas (TORANZOS & McFETERS, 1997).

A proximidade de um ambiente poluído pode resultar em contaminação de plantações através da transferência de bactérias patogênicas mediada por animais ou mais generalizadamente através de água de superfície (NGUEYEN-THE & CARLIN, 1994).

Segundo BEUCHAT (1999), a contaminação de vegetais crus e frutas com *E. coli* O157:H7 pode ocorrer quando o gado, ou talvez outros ruminantes, tais como cervo, inadvertidamente entram na plantação, ou quando adubos impróprios forem aplicados como fertilizantes. A água eliminada da pastagem e a aplicação de esgoto não tratado ou de água de irrigação ao solo também representam possíveis fontes de contaminação com este microrganismo. Esse mesmo autor acredita que os mecanismos de contaminação são no momento um tanto quanto especulativos e que devem ser melhor investigados antes de introduzir-se intervenção apropriada para a redução de riscos.

O risco de contaminação do vegetal durante a colheita e processamento é também uma função da habilidade do patógeno de sobrevivência no solo (NGUEYEN-THE & CARLIN, 1994). Segundo NICHOLS *et al.* (1971), a *E. coli* pode sobreviver no campo por mais de 21 dias em alface irrigado com água poluída.

Com relação à vegetais e frutas minimamente processados (MPF), NGUEYEN-THE & CARLIN (1994) relatam que a legislação e recomendações implementadas para assegurar boas higiene e qualidade desses produtos, relacionam-se às condições de produção, especificações microbiológicas para o produto processado e armazenamento; mas que deveria ser aconselhável estender as boas práticas de produção para o suprimento de matéria-prima, particularmente para prevenir contaminação por água de esgoto ou adubação durante o cultivo. Esses mesmos autores acreditam que as boas práticas de produção e o sistema de análise de riscos e pontos críticos de controle (HACCP) são necessários para controlar fatores relacionados à contaminação, sobrevivência e crescimento de microrganismos em cada estágio da cadeia alimentar.

O crescimento na demanda de vegetais prontos para o consumo pelos consumidores e serviços de alimentação tem resultado em um rápido aumento deste comércio na América do Norte nos últimos 5 anos e um crescimento de 100% foi reportado nos EUA por NEFF (1994). GARRETT (1996 citado por LIN *et al.*, 1996) informou que o mercado de saladas prontas para o consumo aumentou de 167 milhões de dólares em 1991 para 507 milhões em 1994 e que a estimativa para 1995 era de 900 milhões de dólares.

Nos EUA e em outros países, o processamento de produtos frescos prontos para o consumo é uma indústria emergente. HURST & SCHULER (1992), em um estudo sobre a perspectiva da indústria de processamento de produtos frescos, citaram dois principais fatores à impulsionar este crescimento. Primeiro, os consumidores vêm os vegetais e frutas frescas como alimentos saudáveis e nutritivos além de práticos por não exigirem maior preparo prévio. Segundo, os produtores se beneficiam da vantagem de poder oferecer um produto padronizado com menos gasto de mão-de-obra. Esses mesmos autores apontam o comércio de produtos prontos para o consumo como um alvo para o mercado futuro.

Neste estudo fez-se a identificação presuntiva da enterobactéria *E. coli* nas amostras de água e alface. Sua presença pode ser um indicador da

poluição fecal. Como a presença de *E. coli* tem importância na higiene e saúde, deve-se tomar cuidado durante o processamento e preparo dos vegetais para que os mesmos não sejam contaminados por esta bactéria.

Através da técnica dos tubos múltiplos foram isolados um total de 210 culturas de prováveis *E. coli*, sendo 114 provenientes de amostras de águas de irrigação e 96 provenientes de amostras de alfaces. A distribuição do número de culturas isoladas por horta pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição do número de prováveis *E. coli* isoladas através da técnica do NMP a partir de amostras de águas e alfaces em 2 hortas na região de Campinas.

Numeração das hortas	Nº. de culturas isoladas		
	Total	amostras de águas	amostras de alfaces
1	72	34	38
2	138	80	58
Total	210	114	96

5.1.3. Isolamento de *E. coli* O157:H7

As tentativas de isolamento de possíveis linhagens de *E. coli* O157:H7 foram realizadas a partir de colônias vermelhas das placas de Petrifilm EC e das amostras de água e alface provenientes de 7 hortas da região de Campinas.

Nas placas de Petrifilm EC, as colônias de *E. coli* O157:H7 não são diferenciadas das colônias de coliformes pois ambas são β - glicuronidase negativas e formam colônias vermelhas. Portanto, para o isolamento de *E. coli* O157:H7 isolou-se até 10 colônias vermelhas, escolhidas aleatoriamente nas placas de Petrifilm EC que apresentaram diluições apropriadas, ou seja, diluições onde as colônias não estavam aglomeradas, sendo viável o isolamento com a alça de platina. Procedeu-se o teste de fermentação do sorbitol em meio Sorbitol MacConkey Ágar (SMAC) e posterior confirmação de *E. coli* das linhagens sorbitol-negativas em meio EMB.

Nenhuma das colônias vermelhas, isoladas de Petrifilm EC que não fermentaram o sorbitol no meio SMAC, apresentaram colônias típicas de *E. coli* em meio EMB.

Através das tentativas de isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de amostras de água (1 amostra/horta) e alface (2 amostras/horta) provenientes de 7 hortas da região de Campinas foram isoladas 24 culturas provenientes das amostras de águas de irrigação e 37 provenientes das amostras de alfaces, totalizando portanto 61 isolados que posteriormente foram levados a testes bioquímicos e molecular para averiguar-se a presença de *E. coli* O157:H7. O número de prováveis *E. coli* isoladas a partir de amostras de água e alface de acordo com o local de amostragem pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Número de prováveis *E. coli* obtidas através de isolamento em meio EC a 42°C de amostras de água e alface em 7 hortas na região de Campinas.

Numeração Das hortas	Nº. de culturas isoladas	
	amostras de águas	amostras de alfaces
3	7	20
4	-	10
5	13	-
6	-	3
7	-	-
8	4	3
9	-	1
Total	24	37

5.2. Caracterização das culturas puras

5.2.1. Coloração de Gram

Trezentas e três culturas isoladas (210 isolamentos através do NMP, 32 através do Petrifilm EC e 61 em meio EC a 42°C) foram submetidas a coloração de Gram. Todas apresentaram característica morfológica de *E. coli*, coco-bacilos Gram negativo.

5.2.2. Fermentação da lactose

Dentre as 303 culturas isoladas, caracterizadas como coco-bacilos Gram negativas, 3 não fermentaram a lactose em caldo lactose a 37°C/24-48 h e portanto foram desprezadas. Essas 3 culturas lactose-negativas foram isoladas em meio EC a 42°C a partir de amostras de alface.

5.2.3. Galeria bioquímica api 20E

A confirmação de *E. coli* e verificação dos perfis bioquímicos das culturas puras isoladas pela técnica dos tubos múltiplos ou Petrifilm EC foi realizada através da galeria bioquímica api 20E.

Como o isolamento de *E. coli* pelo método do NMP deu-se em duplicata, ou seja, de cada placa em meio E M B com colônias típicas de *E. coli* transferiu-se 2 colônias isoladas para tubos inclinados de PCA (totalizando 210 isolados), para este teste trabalhou-se com apenas uma das colônias de cada placa (totalizando 104 isolados). Portanto, 136 culturas foram submetidas à galeria bioquímica api 20E sendo 32 culturas isoladas através da técnica do Petrifilm EC e 104 culturas isoladas pela técnica do NMP.

Nove isolados (5 provenientes do teste do NMP sendo 4 isolados de água e 1 de alface e 4 isolados de água a partir de placas de Petrifilm EC) apresentaram perfis bioquímicos inaceitáveis para *E. coli*. Dos 5 isolados provenientes do teste do NMP que não foram confirmados como *E. coli*, dois apresentaram possibilidade de ser *Enterobacter sakazakii*; um apresentou baixa discriminação para *E. coli* (amilose positivo), com 84% de possibilidade de ser do gênero *Kluyvera*; um obteve identificação não válida (citrato positiva, lisina descarboxilase negativa, produção de H₂S positiva, inositol e amilose positivas) com 41% de possibilidade de ser *Citrobacter koseri/farmeri* e um isolado (indol negativo) apresentou 83% de possibilidade de ser *Citrobacter freundii*. Dentre os quatro isolados obtidos de amostras de água em placas Petrifilm EC que não foram confirmados como *E. coli*, três (amilose positivo) apresentaram 84% de probabilidade de ser do gênero *Kluyvera* e um isolado (indol negativo) apresentou baixa discriminação (49%) para *E. coli*.

Dentre os outros 127 isolados foram verificados um total de 15 perfis bioquímicos diferentes (Tabela 7). Entre os isolados provenientes de amostras de água, a variabilidade de perfis bioquímicos encontrada foi maior

(14 perfis bioquímicos) do que entre os isolados provenientes de amostras de alface (6 perfis bioquímicos).

Tabela 7. Perfis bioquímicos verificados através da galeria api 20E em 20 amostras de água de irrigação e em 20 amostras de alfaces em 2 hortas na região de Campinas.

Códigos	Total	Nº. de culturas isoladas	
		amostras de água	amostras de alface
1	1	0	1 (2,10)
2	97	61 (77,20)	36 (75,00)
3	3	3 (3,79)	0
4	8	1 (1,27)	7 (14,50)
5	1	1 (1,27)	0
6	5	3 (3,79)	2 (4,20)
7	2	1 (1,27)	1 (2,10)
8	1	1 (1,27)	0
9	2	1 (1,27)	1 (2,10)
10	1	1 (1,27)	0
11	1	1 (1,27)	0
12	2	2 (2,52)	0
13	1	1 (1,27)	0
14	1	1 (1,27)	0
15	1	1 (1,27)	0
Total	127	79 (100,00)	48 (100,00)

() porcentagem; valores ajustados para 100%.

Dos 14 perfis bioquímicos verificados em isolados provenientes de amostras de água, apenas 5 (códigos 2, 4, 6, 7 e 9) foram também observados em isolados provenientes de amostras de alface. Um perfil bioquímico observado em um isolado proveniente de amostra de alface (código 1) não foi observado em água, indicando que a origem desta bactéria no vegetal pode ser outra que da água de irrigação.

O perfil bioquímico de código 2, foi o predominante tanto nos isolados de amostras de água de irrigação (77,20%) como nas amostras de alface (75,0%). O perfil bioquímico dos isolados de código 2 representa as bactérias com atividade da β -galactosidase positiva (+); descarboxilação da arginina negativa (-); descarboxilação da lisina e ornitina (+); utilização do citrato

como única fonte de carbono (-); produção de H₂S (-); atividade da urease (-); atividade da triptofano desaminase (-); produção de indol (+); produção de acetoína (-); atividade da gelatinase (-); fermentação da glicose, manitol, sorbitol, rafinose, sacarose, melibiose e arabinose (+); fermentação do inositol e amigdalina (-) e citocromo-oxidase (-) (ONPG+, ADH-, LDC+, ODC+, CIT-, H₂S-, URE-, TDA-, IND+, VP-, GEL-, GLU+, MAN+, SOR+, RHA+, SAC+, ML+, ARA+, INO-, AMY- e OX-).

5.2.4. Sorologia:

Das 127 culturas confirmadas como *E. coli* através da utilização da galeria bioquímica api 20E, 2 isolados (1,6% dos isolados), ambos provenientes de colônias azuis em placas Petrifilm EC a partir de amostras de água de irrigação, não fermentaram o sorbitol.

Segundo WELLS *et al.* (1983), 93% das *E. coli* isoladas de origem humana, fermentam o sorbitol dentro de 24 horas. Como é sabido que a maioria das *E. coli* são sorbitol-positiva e que as linhagens de *E. coli* O157:H7 são sorbitol-negativas (WELLS *et al.* 1983; PADHYE & DOYLE, 1992 e WARE *et al.*, 2000), realizou-se o teste sorológico de aglutinação contra o antissoro O157 para verificar-se a ocorrência de linhagens deste sorogrupo.

As duas linhagens de *E. coli* sorbitol-negativas testadas não apresentaram reação de aglutinação contra o antissoro O157.

5.2.5. Testes em meio TSI e LIM

Realizou-se os testes de crescimento em meio TSI (ágar triplice açúcar) e LIM (lisina, indol, motilidade) para a confirmação de *E. coli* das culturas puras isoladas em meio EC a 42°C, caracterizadas como cocobacilos, Gram negativas e lactose positivas.

Das 61 culturas puras isoladas através de incubação em meio EC a 42°C, 58 foram testadas em meios TSI e LIM, as outras 3 foram desprezadas pois não fermentaram a lactose em caldo lactose a 42°C/24-48h.

Das 58 culturas isoladas testadas nos meios TSI e LIM, 4 (provenientes de amostras de alface) não produziram gás e apresentaram o fundo do tubo escuro em meio TSI, indicando produção de H₂S, gás sulfídrico. Essas mesmas culturas, apresentaram resultados negativos para a descarboxilação da lisina, produção de indol e motilidade; sendo portanto descartadas pois esses resultados não correspondem aos padrões de reações bioquímicas característicos de *E. coli*.

5.2.6. Testes em meio O157:H7 ID e SMAC

Para averiguar-se a presença de *E. coli* O157:H7, estriou-se em superfície em meios seletivos as 54 culturas puras obtidas de amostras de águas de irrigação (24) e de amostras de alfaces (30) confirmadas como *E. coli* pelo teste de crescimento em meio TSI e LIM. Foram utilizados os meios SMAC e O157:H7 ID.

Neste estudo, nenhuma das 54 culturas isoladas apresentou colônias típicas de *E. coli* O157:H7 em ambos os meios testados.

Embora extremamente útil, o isolamento e identificação de *E. coli* O157:H7 baseado na ausência de fermentação do sorbitol apresenta algumas limitações. Outras bactérias entéricas, tais como *Escherichia hermannii* e *Hafnia* spp., também apresentam este mesmo fenótipo mostrando portanto colônias semelhantes às dos sorotipo O157:H7 em meios contendo sorbitol. Igualmente, estirpes de O157, de sorotipo não H7 que não são patogênicas e que não fermentam o sorbitol foram ocasionalmente isoladas de alimentos (WILLSHAW *et al.*, 1993). Devido a presença de espécies fenotipicamente semelhantes, os isolados sorbitol negativo devem ser confirmados sorologicamente com antissoro O157:H7 (PADHYE & DOYLE, 1992).

PARK *et al.* (1998), também alertaram para o fato de que uma vez as colônias suspeitas em meio SMAC tenham sido identificadas, faz-se necessária a confirmação do isolado como O157:H7 através da identificação bioquímica de linhagens de *E. coli* e demonstração da presença de antígenos somáticos e flagelares (O157, H7). Segundo esses mesmos autores, esses passos são necessários já que outras bactérias podem possuir antígenos que sejam idênticos ou que apresentem reação cruzada com cepas O157. Tal grupo inclui outros sorovares de *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* grupo N, *Brucella abortus*, *Vibrio cholerae* O1, muitas espécies do gênero *Citrobacter* e *Escherichia hermannii*.

Os meios contendo sorbitol podem também excluir o isolamento de outros sorovares de *E. coli* patogênicas, muitos dos quais fermentam o sorbitol. Mesmo sendo o sorotipo O157:H7 o patógeno predominante mundialmente é sabido que um amplo número de outros sorovares também produzem Shigatoxina. Embora muitos desses não tenham sido relacionados à doenças ou sejam conhecidos por causarem somente diarreias não sanguinolentas, alguns estudos verificaram que estirpes produtoras de Shigatoxina, do sorovar não O157:H7 devem ter sido responsáveis por casos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica na Europa (GUNZER *et al.*, 1992; MARIANI-KURKDIJIAN *et al.*, 1993).

A frequência de infecções causadas por bactérias EHEC-não O157, estimadamente, é similar àquelas causadas por EHEC O157. Porém, os testes clínicos com habilidade limitada para se estimar a verdadeira frequência de EHEC-não O157, resultam na baixa detecção destas bactérias em surtos e casos de infecção alimentar. Por exemplo, em 1999, somente 3% dos laboratórios clínicos da rede alimentar (Food Net) reportaram sempre realizar imunoenaios para Shigatoxina em exames de fezes. A maioria dos sorogrupos das EHEC-não O157 isolados de humanos em 1999 foram O26, O111, O103 e O121; esses 4 grupos representam 62% das EHEC-não O157 (GRIFFIN *et al.*, 2000).

Uma descoberta relevante com fortes implicações com relação à confiança na fermentação do sorbitol na identificação de patógenos, foi verificada por FRATAMICO *et al.* (1993) em um estudo que demonstrou que isolados do sorovar O157:H7 podem sofrer mutação do fenótipo sorbitol-negativo (não fermentam o sorbitol) para sorbitol-positivo (fermentam o sorbitol). Segundo estes mesmos autores, os métodos de rastreamento que utilizam o meio SMAC podem não ser suficientes para a detecção de todos os organismos de *E. coli* dos sorotipos O157:H7 e O157:NM (não móvel), já que algumas linhagens podem fermentar o sorbitol ou o organismo pode sofrer mutação mostrando um fenótipo sorbitol-positivo tanto em produtos alimentícios como se cultivado em meio contendo sorbitol. Além do mais, o uso do meio SMAC não seria útil na detecção de outras EHEC sorbitol-positivas, como por exemplo as do sorotipo O26:H11.

Devido à emergência de *E. coli* como um importante patógeno alimentar, faz-se urgentemente necessário o desenvolvimento de métodos seguros para a detecção deste microrganismo em amostras de alimentos e em espécimes de pacientes.

Técnicas de biologia molecular e imunologia utilizadas para a detecção da toxina (VT) e de seus genes promotores, são os métodos mais adequados para a identificação destes patógenos em espécimes clínicos (BONNET *et al.*, 1998).

5.2.7. Caracterização molecular

Neste estudo, realizou-se a técnica do PCR a fim de verificar-se a presença ou não de genes que codificam a produção de verotoxinas.

Foram submetidos à técnica do PCR os 181 isolados que tiveram a confirmação positiva de *E. coli* através da galeria api 20E (127 isolados, sendo 99 obtidos através da técnica dos tubos múltiplos e 28 através do Petrifilm EC) ou dos testes TSI/LIM (54 isolados).

Com os *primers* utilizados nenhuma das 181 amostras submetidas a amplificação de DNA apresentaram genes que codificam a produção de verotoxinas, ou seja, não foram observadas bandas de DNA semelhantes às bandas do controle positivo de *E. coli* O157:H7 (Figura 3).

Os métodos convencionais para identificar as VTEC incluem detecção sorológica das verotoxinas de isolados de *E. coli* após determinação das características bioquímicas dos mesmos. Para a detecção das VT, muitos pesquisadores já relataram a especificidade da amplificação dos DNAs do gene que codificam as verotoxinas pela técnica do PCR (FRATAMICO *et al.*, 1995; MENG *et al.*, 1997 e NAGANO *et al.*, 1998).

Devido ao vasto conhecimento das bases genéticas da virulência de *E. coli* os métodos genéticos são cada vez mais aplicados na detecção e tipificação de *E. coli*. Esses métodos apresentam alta resolução, um bom potencial para automatização e sob certas condições podem até evitar as etapas de cultura de bactérias. A reação de polimerase em cadeia permite uma detecção rápida e direta dos genes de virulência em uma amostra mesmo sem cultivo prévio do organismo. Além disso, esta técnica é particularmente útil para a detecção de um baixo número de contaminação em alimentos e também para a análise de amostras clínicas. Outra vantagem é a sua especificidade e capacidade de determinar certas variantes do gene alvo presente em determinadas linhagens. Sequências gênicas especificamente

ampliadas pela técnica do PCR podem ser usadas para detecção e identificação mais precisa das *E. coli* (KUHNER, 2000).

LIN *et al.* (1993), acreditam que a técnica do PCR é um método rápido, específico e sensível para a detecção de genes que codificam a produção de verotoxinas e que o par de *primers* comuns por eles desenvolvidos poderá ser muito útil em estudos epidemiológicos e clínicos de infecção por este patógeno.

As linhagens verotoxigênicas do sorovar enterohemorrágico O157:H7 possuem algumas características que as diferenciam das outras EHEC e facilitam seu cultivo e detecção. Porém, para se detectar as EHEC que diferentemente das do sorotipo O157:H7 fermentam o sorbitol e são β -glicuronidase positivas, precisa-se investigar a produção de verotoxinas por técnicas fenotípicas (citotoxicidade em células Vero ou Hela), genotípicas (hibridização, PCR) ou imunológicas (ELISA e separação imunomagnética-SIM) (BLANCO *et al.*, 1996).

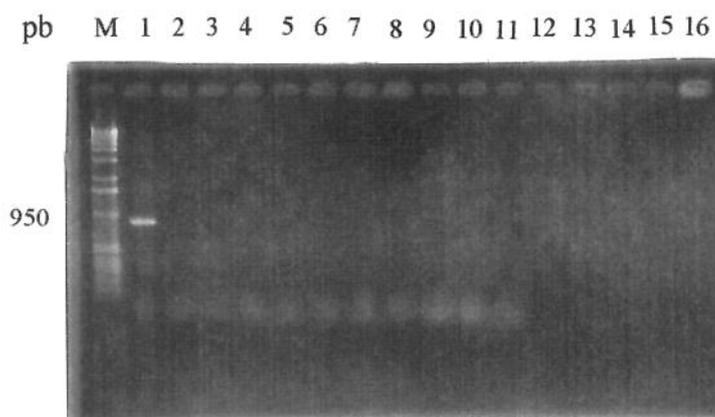
Embora dados na literatura tenham apontado que estirpes do sorotipo O157:H7 crescem pobremente em temperaturas acima de 44°C (DOYLE & SCHOENI, 1984), outro estudo mais recente (PALUMBO *et al.*, 1995) demonstrou que quase todas estirpes O157 testadas cresceram a 45°C. Desta forma, parece provável que a metodologia utilizada neste estudo em um dos métodos de isolamento, com incubação a 44,5°C em meio EC (item 4.2.2), não tenha sido um fator limitante para a ocorrência de estirpes do sorotipo O157:H7.

BLANCO *et al.* (1996), relata que o isolamento de EHEC em amostras com um baixo conteúdo de *E. coli* por grama pode levar à conclusões práticas interessantes. A presença de *E. coli* em alimentos em números suficientemente elevados ($> 10^2/g$ em carne fresca) indica uma provável contaminação fecal e a presença de outros microrganismos patogênicos como, por exemplo, salmonelas. Mas, como enteropatógena que pode ser, os números geralmente aceitáveis, adquirem um novo significado, já que somente a presença de uma bactéria de *E. coli* O157:H7 por grama seria suficiente para representar um grave risco de infecção alimentar.

Atualmente, nos Estados Unidos da América e no Canadá, estão revisando as leis sanitárias e acredita-se que quando encontrar-se disponível uma técnica rápida e segura para aplicar-se rotineiramente nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, introduzir-se-a na legislação o requisito de

ausência de *E. coli* O157:H7 em 25 g, tal como se exige há anos para *Salmonella* e *Shigella* (BLANCO *et al.*, 1996).

Figura 3. Eletroforese em gel de ágar à 1,5% de DNAs amplicados por PCR. M, marcador de DNA de 1 Kb; linha 1, *E. coli* O157:H7; linhas 2-17, culturas isoladas.



6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos inicialmente propostos e os resultados experimentais alcançados, esta pesquisa permitiu as seguintes conclusões:

- Os valores obtidos na determinação de coliformes totais e fecais pela técnica do NMP em 10 amostras de água de irrigação das hortas 1 e 2 foram na sua maioria superiores aos valores recomendados pelas normas da CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 20 de 10 de junho de 1986, para águas de irrigação de hortaliças consumidas cruas.
- Os valores obtidos na determinação presuntiva de *E. coli* pela técnica do NMP em 10 amostras de alface das hortas 1 e 2 foram na sua maioria satisfatórios pelos padrões da PHLS (Public Health Laboratory Service) para alfaces no ponto de venda.
- Entre os isolados provenientes de amostras de água observou-se uma maior variabilidade de perfis bioquímicos (14 perfis bioquímicos) do que entre os isolados provenientes de amostras de alface (6 perfis bioquímicos).
- Dos 14 perfis bioquímicos verificados em isolados provenientes de amostras de água, apenas 5 foram também observados em isolados provenientes de amostras de alface. Um perfil bioquímico observado em um isolado proveniente de amostra de alface não foi observado em água, indicando que a origem desta bactéria no vegetal pode ser outra que da água de irrigação.
- A maioria dos isolados, tanto de amostras de alface, como de amostras de água de irrigação são de um mesmo perfil bioquímico.
- Nos meios seletivos para *E. coli* O157:H7 utilizados nenhum isolado apresentou colônias típicas deste patógeno.
- Com os *primers* utilizados nenhum dos 181 isolados submetidos à técnica do PCR apresentou genes que codificam a produção de verotoxinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, M. R. ; MOSS, M. O. *Escherichia coli*. In: ADAMS, M. R. ; MOSS, M. O. **Food microbiology**. Blackhorse Rd.: The Royal Society of Chemistry, 1995. 398p.
2. ABDUL-RAOUF, U. M.; BEUCHAT, L. R.; AMMAR, M. S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad and vegetables. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.59, p. 1999-2006, 1993.
3. ALBRECHT, J. A; HAMOUZ, F. L.; SUMNER, S. S.; MELCH, V. Microbial evaluation of vegetable ingredients in salad bars. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 58, p. 683-685, 1995.
4. BARNARD, R. J.; DURAN, A. P.; SWARTZENTRUBER, A., SHWAB, A. H; WENTZ, B. A.; READ JR., R. B. Microbial quality of frozen cauliflower, corn, and peas obtained at retail markets. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 44, p. 54-58, 1982.
5. BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 53, p. 804-817, 1990.
6. BESSER, R. E.; LETT, S. M.; WEBER, J. T.; DOYLE, M. P.; BARRETT, T. J.; WELLS, J. G.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **JAMA**, v. 269, p. 2217-2220, 1993.
7. BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.59, p. 204-216, 1995.
8. BEUCHAT, L. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 62, n. 8, p. 845-849, 1999.
9. BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M.A; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of

- verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p. 2559-2564, 1989.
10. BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; RIO, M.; PRADO, C.; FRENÁNDEZ, L.; ALONSO, M.P.; RODRÍGUEZ, A. *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT): un importante patógeno emergente responsable de intoxicaciones alimentarias. **Alimentaria**, Madri, v. 34, n. 275, p. 93-98, 1996.
 11. BOCKEMUHL, J.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Serological and biochemical properties of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing strains of *Escherichiacoli*, other than O-group 157, from patients in Germany. **International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infection Disease**, v.276, p. 189-195, 1992.
 12. BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A, BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 497-503, 1999.
 13. BONNET, R.; SOUWEINE, B.; GAUTHIER, G.; RICH, C.; LIVRELLI, V.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Non-O157-H7 Stx2-Producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1777-1780, 1998.
 14. BORCZYK, A. A.; HARNETT, N.; LOMBOS, M.; LIOR, H. False-positive identification of *Escherichia coli* O157 by commercial latex agglutination test. **The Lancet**, London, n. 3336, p. 946-947, 1990.
 15. BORCZYK, A. A.; LIOR, H.; THOMPSON, S. Sorbitol negative *Escherichia coli* O157 other than H7. **The Journal of Infection**, London, v. 18, p. 198-199, 1989.
 16. BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 5^a ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994. 909 p.

17. CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, E. C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 60, n. 2, p. 177-180, 1997.
18. CRAY JR., W. C.; MOON, H. W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 1586-1590, 1995.
19. D' Aoust, J. Y.; PARK, C. E.; SZABO, R. A.; TODD, E. C. D.; EMMONS, D. B.; MCKELLAR, R. C. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 71, p. 3230-3236, 1988.
20. DEL ROSARIO, B. A.; BEUCHAUT, L. R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 58, p. 105-107, 1995.
21. DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 48, p. 855-856, 1984.
22. DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n. 12, p.289-302, 1991.
23. DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology : fundamentals and frontiers**. Washington, D.C.: ASM Press, 1997. 768p.
24. FAIN, A. R. A review of the microbiological safety of fresh salads. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Iowa, v. 16, p. 146-149, 1996.
25. FEATHERSTONE, C. *Escherichia coli* O157: superbug or mere sensation? **The Lancet**, London, v. 349, p. 930, 1997.

26. FENG, P. C. S.; HARTMAN, P. A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 41, p. 1320-1329, 1982.
27. FRANKEL, G.; KNUTTON, S.; PHILLIPS, A. Adherence mechanisms and STEC intestinal colonization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 4., Kyoto, 2000. **Program & Abstracts**. p. 39.
28. FRATAMICO, P.M.; BUCHANAN, R.L.; COOKE, P.H. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, n. 12, p. 4245-4252, 1993.
29. FRATAMICO, P.M.; SACKITEY, S.K.; WIEDMANN, M.; DENG, M.Y. Detection of *Escherichia coli* O157 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 2188-2191, 1995.
30. GONZALEZ, A.G.M; CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.M.; LIBERAL, M.H.T.; POMBO, C.R.; JOAQUIM, R.M; ANDRADE, J.R.C. Occurrence of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and O157:H7 strains in cattle from Rio de Janeiro State, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 4., Kyoto, 2000. **Program & abstracts**. p. 68.
31. GRIFFIN, P.M.; MEAD, P.S.; VAN GILDER, T.; HUNTER, S.B.; STROCKBINE, N.A.; TAUXE, R.V. Shiga toxin-producing *E. coli* infections in the United States: current status and challenges. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 4., Kyoto, 2000. **Program & abstracts**. p. 31.
32. GUNZER, F.; BÖHM, H.; RÜSSMANN, H.; BITZAN, M.; ALEKSIÉ, S.; KARCH, H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1807-1810, 1992.

33. GUTIERREZ, E. Japan prepares as O157 strikes again. **The Lancet**, London, v. 349, p.1156, 1997.
34. HALDANE, D.J.M.; DAMM, M.A.S.; ANDERSON, J.D. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for Vero (Shiga-like)-toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 24, p.652-653, 1986.
35. HARA-KUDO, Y.; KONUMA, H.; IWAKI, M.; KASUGA, F.; SUGITA-KONISHI, Y.; ITO, Y.; KUMAGAI, S. 1997. Potencial hazard of radish sprouts as a vehicle of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 60, p. 1125-1127, 1997.
36. HIL, J.H.; GYLES, C.; MOROOKA, T.; KARMALI, M.A; CLARKE, R.; DE GRANDIS, S.; BRUTON, J. L. Development of verotoxin2-and verotoxin 2 variant (VT2v)-specific oligonucleotide probes on the basis of the nucleotide sequence of the B cistron of VT2v from *Escherichia coli* E32511 and B2F1. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2704-2709, 1991.
37. HOLT, J.G; KRIEG, N.R; SENEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9^{ed}. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
38. HURST, W.C.; SCHULER, G.A. Fresh produce processing-an industry perspective. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 55, p. 824-827, 1992.
39. JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5^{ed}. New York: Chapman Hall, 1996. 661p.
40. JOHNSON, R.P.; CLARKE, R.C.; WILSON, J.B. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 59, p. 1112-1122, 1996.
41. JINNEMAN, K.C.; TROST, P.A.; HILL, W.E.; WEAGANT, S.D.; BRYAN, J.L.; KAYSNER, C.A.; WEKELL, S. D. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia*

- coli* O157 shiga-like toxins type I and II by multiplex polymerase chain reaction. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 58, p. 722-726, 1995.
42. KARCH, H.; MEYER, T. Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p. 2751-2757, 1989.
43. KELLY, M.T.; BRENNER, D.J.; FRAMER, J.J. *Enterobacteriaceae*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1995. p.1482.
44. KHAKHRIA, R.; DUCK, D.; LIOR, H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 105, p. 511-520, 1990.
45. KIM, H.H.; SAMADPOUR, M.; GRIMM, L.; CLAUSEN, C.R.; BESSER, T.E.; BAYLOR, M.; KOBAYASHI, J.M.; NEILL, M.A.; SCHOENKNECHT, F.D.; TARR, P.I. Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991. **Journal Infection Disease**. v. 170, p. 1606-1609, 1994.
46. KLEANTHOUS, H.; FRY, N.K.; SMITH, H.R.; GROSS, R.J.; ROWE, B. The use of sorbitol-MacConkey agar in conjugation with a specific antiserum for the detection of verotoxin-producing strains of *Escherichia coli* O157. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 101, p. 327-335, 1988.
47. KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. 1165p.
48. KOCH, W.H.; PAYNE, W.L.; WENTZ, B.A.; CEBULA, T.A. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, p. 556-560, 1993.
49. KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**. Amsterdam, v. 24, p. 107-117, 2000.

50. LAMPEL, K.A.; JAGOW, J.A.; TRUCKSESS, M.; HILL, W.E. Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. **Applied Environmental Microbiology**. Baltimore, v. 56, p. 1536-1540, 1990.
51. LEHMACHER, A; MEIER, H.; ALEKSIC, S.; BOCKEMUHL. J. Detection of hemolysin variants of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar. **Applied Environmental Microbiology**., Baltimore, v. 64, p. 2449-2453, 1998.
52. LEVINE, M.M.; XU, J.G.; KAPER, J.B.; LIOR, H; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and others serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Infection Disease**. v. 156, p. 175-182, 1987.
53. LIN, C-M.; FERNANDO, S.Y.; WEI, C-I. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetables salads. **Food Control**, Surrey, v. 7, p. 135-140, 1996.
54. LIN, Z.; KURAZONO, H.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. **Microbiology Immunology**, Tokyo, v. 37, n. 7, p. 543-548, 1993.
55. LITTLE, C.; ROBERTS, D.; YOUNGS, E. ; LOUVOIS, J. Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuces: A PHLS food working group study. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 62, n. 4, p.325-328, 1999.
56. MACKENZIE, A.M.; LEBEL, P.; ORRBINE, E.; ROWE, P.C.; HYDE, L.; CHAN, F.; JOHNSON, W.; MCLAINE, P.N. Sensitivities and specificities of premier *E. coli* O157:H7 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (shiga-like toxin) producing *Escherichia coli*. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1608-1611, 1998.

57. MADDEN, J.M. Microbial Pathogens in fresh produce- the regulatory perspective. **Journal Food Protection, Iowa**, v. 55, p. 821-823, 1992.
58. MARIANI-KURKDIJIAN, P.; DENAMUR, E.; MILON, A.; PICARD, B.; CAVE, H.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Identification of *Escherichia coli* O103:H2 as a potencial agent of hemolytic-uremic syndrome in France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 296-301, 1993.
59. MARTINS, M.F.; ROSSI, N.M.M.; FERREIRA, A.; BROCCCHI, M.; YANO, T.; CASTRO, A.F.P.; SILVEIRA, W.D. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amesterdan, v. 76, p. 51-59, 2000.
60. MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 51, p. 179-184, 1994.
61. MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M.P.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S. A multiplex PCR for identifying shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, p. 172-176, 1997.
62. MERSON, M.H.; MORRIS, G.K.; SACK, D.A.; WELLS, J.E.; FEELEY, J.C.; SACK, R.B.; CREECH, W.B.; KAPIKIAN, A.Z.; GAGAROSA, E.J. Travelers' diarrhea in Mexico. **New English Journal of Medicine**, Walthan, v. 294, p. 1299-1305, 1976.
63. MOE, C.L. Water borne transmission of infectious agents. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, C.R.; MCLNERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M. V. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. Washington, D.C.: ASM Press, 1997.
64. MOLENDIA, J.R. *Escherichia coli* (including O157:H7): An environmental health perspective. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.14, n. 12, p. 742-747, 1994.

65. MURASE, T.; OKITSU, T.; SUZUKI, R.; MOROZUMI, H.; MATSUSHIMA, A. NAKAMURA; YAMAI, S. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, p. 673-676, 1995.
66. NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; ITOH, Y.; WU, Z.; TAKAHASHI, T. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 371-376, 1998.
67. NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 52, p. 123-153, 1999.
68. NEFF, J. Salad days for pre-cut produce. **Food Bus.**, v. 7, p. 18-22, 1994.
69. NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 4, p. 371-401, 1994.
70. NICHOLS, A.E.; DAVES, P.A.; KING, K.P.; WINTER, E.J. BLACKWALL, F.L.C. Contamination of lettuce irrigated with sewage effluent. **Journal of Hort. Science**, London, v. 46, p. 425, 1971.
71. ODUMERU, J.A.; MITCHELL, S.J.; ALVES, D.M.; LYNCH, J.A.; YEE, A.J.; WANG, S.L.; STYLIADIS, S.; FARBER, J.M. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 60, p. 954-960, 1997.
72. OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; MATNER, R. An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilm™ test kit-HEC-for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.53, p. 936-940, 1990.

73. PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 55, p. 555-565, 1992.
74. PALUMBO, S.A.; CALL, J.E.; SCHULTZ, F.J. ; WILLIAN, A.C. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 58, p. 352-356, 1995.
75. PARK, C.H.; MARTIN, E.A.; HITE, E.L. Isolation of a nonpathogenic strain of *Citrobacter sedlakii* which express *Escherichia coli* O157 antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1408-1409, 1998.
76. POLLARD, D.R.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K.R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polimerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 540-545, 1990.
77. PRADO, V. 2000. Epidemiologic features of STEC (EHEC) infections in Latin America. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) – PRODUCING ESCHERICHIA COLI INFECTIONS, 4., Kyoto, 2000. **Program & Abstracts**. p.32.
78. RAFIL, F.; HOLLAND, M.A.; HILL, W.E.; CERNIGLIA, C.E. Survival of *Shigella flexneri* on vegetables and detection by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, p. 727-732, 1995.
79. RAGHUBEER, E.V.; MATCHES, J.R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 803-805, 1990.
80. RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGELSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HERBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New English Journal of Medicine**, Waltham, v. 308, n. 681- 685, 1983.

81. RIPPEY, S.R.; CHANDLER, L.A.; WATKINS, W.D. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shell-fish. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 50, p. 685-690, 1987.
82. RUSSMANN, H.; SCHMIDT, H.; HEESEMANN, J.; CAPRIOLI, A.; KARCH, H. Variants of shiga-like toxin II constitute a major patients with haemolytic uraemic syndrome. **Journal Medical Microbiology**, Essex, v. 40, p. 338-343, 1994.
83. SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-491, 1987.
84. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.
85. STEELE, B.T.; MURPHY, N.; RANCE, C.P. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. **Journal of Pediatr.** v. 101, p. 963-965, 1982.
86. TARR, P.; NEILL, M.A. Perspective; the problem of non-O157:H7 Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infection Disease.** v. 174, p. 1136-1139, 1996.
87. TAUXE, R.V.; KRUSE, H.; HEDERBERG, C.; POTTER, M.; MADDEN, J.; WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce - a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 60, p. 1400-1408, 1997.
88. TORANZOS, G.A. ; MCFETERS, G.A. 1997. Detection of indicators microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, C.R.; MCLNERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M. V. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. Washington, D.C.: ASM Press, 1997.

89. TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1991. 386p.
90. VAN BELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 2, p. 174-184, 1994.
91. WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 2567-2570, 1996.
92. WARE, J.M.; ABBOTT, S.L.; JANDA, J.M. A new diagnostic problem: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains with aberrant biochemical properties. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, New York, v. 38, p. 185-187, 2000.
93. WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; JINNEMN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 58, p. 7-12, 1995.
94. WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 18, p. 512-520, 1983.
95. WERNARS, K.; DELFGOU, E.; SOENTRO, P.S.; NOTERMANS, S. Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in minced meat by using the polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 1914-1919, 1991.
96. WILLSHAW, G.A.; SMITH, R.H.; ROBERTS, D.; THIRLWELL, J.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogrup O157. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p.420-426, 1993.

97. WRIGHT, D.J.; CHAPMAN, P.A ; SIDDONS C.A. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 31-39, 1994.
98. ZADIK, P.M.; CHAPMAN, P.A.; SIDDONS C.A. Use of tellurite for selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal Medical Microbiology**, Essex, v. 39, p. 155-158, 1993.
99. ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; SHERE, J. ; GARBER, L. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 1290-1293, 1995.

8. Anexos

Anexo 1. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de água de irrigação.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / Tubos analisados VB	NMP/mL ^b
1	10 ⁻¹	5/5	130
	10 ⁻²	4/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻²	5/5	460
	10 ⁻³	1/5	
	10 ⁻⁴	1/5	
3	10 ⁻¹	5/5	280
	10 ⁻²	4/5	
	10 ⁻³	3/5	
4	10 ⁻²	5/5	490
	10 ⁻³	2/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
5	10 ⁻¹	5/5	130
	10 ⁻²	4/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	5/5	170
	10 ⁻²	4/5	
	10 ⁻³	1/5	
7	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
8	10 ⁻¹	4/5	17
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻¹	4/5	17
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. VB= caldo verde brilhante.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 2. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de água de irrigação.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados EC	NMP/mL ^b
1	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻¹	5/5	23
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
3	10 ⁻¹	2/5	7
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	1/5	
4	10 ⁻¹	5/5	49
	10 ⁻²	2/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	10 ⁻¹	3/5	11
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	5/5	33
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
7	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
8	10 ⁻¹	1/5	4
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. EC= caldo EC.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 3. Determinação presuntiva de *E. coli* através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de água de irrigação.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados EMB	NMP/mL ^b
1	10 ⁻¹	2/5	5
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
3	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
4	10 ⁻¹	4/5	13
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	10 ⁻¹	2/5	5
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	5/5	23
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
7	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
8	10 ⁻¹	1/5	4
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	

^a Tubos positivos: confirmados em placas com meio Eosina Azul de Metileno (EMB).

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 4. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de água de irrigação.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados VB	NMP/mL ^b
1	10 ⁻¹	5/5	49
	10 ⁻²	2/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻¹	5/5	46
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	1/5	
3	10 ⁻¹	5/5	33
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
4	10 ⁻¹	5/5	79
	10 ⁻²	3/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	S/D ^c	5/5	22
	10 ⁻¹	4/5	
	10 ⁻²	2/5	
6	S/D	5/5	4,9
	10 ⁻¹	2/5	
	10 ⁻²	0/5	
7	S/D	5/5	3,3
	10 ⁻¹	1/5	
	10 ⁻²	0/5	
8	S/D	5/5	3,3
	10 ⁻¹	1/5	
	10 ⁻²	0/5	
9	S/D	2/5	0,9
	10 ⁻¹	2/5	
	10 ⁻²	0/5	
10	S/D	5/5	4,9
	10 ⁻¹	2/5	
	10 ⁻²	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. VB= caldo verde brilhante.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

^c S/D = sem diluição.

Anexo 5. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de água de irrigação.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / Tubos analisados EC	NMP/mL ^b
1	S/D ^c 10 ⁻¹ 10 ⁻²	3/5 2/5 1/5	1,7
2	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	4/5 3/5 0/5	2,7
3	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	5/5 2/5 0/5	4,9
4	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	5/5 2/5 0/5	4,9
5	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	5/5 2/5 0/5	4,9
6	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	4/5 2/5 0/5	2,2
7	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	3/5 1/5 0/5	1,1
8	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	5/5 0/5 0/5	2,3
9	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	2/5 0/5 0/5	0,5
10	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	2/5 0/5 0/5	0,5

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. EC= caldo EC.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

^c S/D = sem diluição.

Anexo 6. Determinação presuntiva de *E. coli* através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de água de irrigação

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados EMB	NMP/mL ^b
1	S/D ^c 10 ⁻¹ 10 ⁻²	2/5 2/5 1/5	1,0-1,1
2	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	2/5 3/5 0/5	1,2
3	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	3/5 1/5 0/5	1,1
4	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	3/5 1/5 0/5	1,1
5	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	4/5 2/5 0/5	2,2
6	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	3/5 2/5 0/5	1,4
7	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	3/5 1/5 0/5	1,1
8	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	5/5 0/5 0/5	2,3
9	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	1/5 0/5 0/5	0,2
10	S/D 10 ⁻¹ 10 ⁻²	1/5 0/5 0/5	0,2

^a Tubos positivos: confirmados em placas com meio Eosina Azul de Metileno (EMB).

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

^c S/D = sem diluição.

Anexo 7. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de alface.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / Tubos analisados VB	NMP/g ^b
1	10 ⁻⁴	5/5	3,3 x 10 ⁴
	10 ⁻⁵	1/5	
	10 ⁻⁶	0/5	
2	10 ⁻³	5/5	2,3 x 10 ³
	10 ⁻⁴	0/5	
	10 ⁻⁵	0/5	
3	10 ⁻³	5/5	1,3 x 10 ⁴
	10 ⁻⁴	4/5	
	10 ⁻⁵	0/5	
4	10 ⁻²	5/5	490
	10 ⁻³	2/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
5	10 ⁻²	5/5	1,7 x 10 ³
	10 ⁻³	4/5	
	10 ⁻⁴	1/5	
6	10 ⁻²	5/5	1,7 x 10 ³
	10 ⁻³	4/5	
	10 ⁻⁴	1/5	
7	10 ⁻²	5/5	230
	10 ⁻³	0/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
8	10 ⁻²	5/5	490
	10 ⁻³	2/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
9	10 ⁻¹	5/5	33
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻³	5/5	7,9 x 10 ³
	10 ⁻⁴	3/5	
	10 ⁻⁵	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. VB= caldo verde brilhante.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

^c S/D = sem diluição.

Anexo 8. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de alface.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / Tubos analisados EC	NMP/g ^b
1	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻¹	4/5	17
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
3	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
4	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	5/5	79
	10 ⁻²	3/5	
	10 ⁻³	0/5	
7	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
8	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻¹	4/5	13
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. EC= caldo EC.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 9. Determinação presuntiva de *E. coli* através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 1 em 10 amostras de alface.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / Tubos analisados EMB	NMP/g ^b
1	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
3	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
4	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	5/5	79
	10 ⁻²	3/5	
	10 ⁻³	0/5	
7	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
8	10 ⁻¹	0/5	< 2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	

^a Tubos positivos: confirmados em placas com meio Eosina Azul de Metileno (EMB).

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 10. Determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de alface.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados VB	NMP/g ^b
1	10 ⁻²	5/5	790
	10 ⁻³	3/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
2	10 ⁻³	5/5	7,0 x 10 ³
	10 ⁻⁴	2/5	
	10 ⁻⁵	1/5	
3	10 ⁻²	5/5	1,3x10 ³
	10 ⁻³	4/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
4	10 ⁻³	5/5	4,6 x 10 ³
	10 ⁻⁴	1/5	
	10 ⁻⁵	1/5	
5	10 ⁻²	5/5	790
	10 ⁻³	3/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
6	10 ⁻²	5/5	490
	10 ⁻³	2/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
7	10 ⁻³	5/5	1,7 x 10 ⁴
	10 ⁻⁴	4/5	
	10 ⁻⁵	1/5	
8	10 ⁻²	5/5	460
	10 ⁻³	1/5	
	10 ⁻⁴	1/5	
9	10 ⁻²	5/5	490
	10 ⁻³	2/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
10	10 ⁻²	5/5	490
	10 ⁻³	2/5	
	10 ⁻⁴	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. VB= caldo verde brilhante.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 11. Determinação de coliformes fecais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de alface.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados EC	NMP/g ^b
1	10 ⁻¹	3/5	8
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻²	2/5	50
	10 ⁻³	0/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
3	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
4	10 ⁻¹	4/5	17
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
7	10 ⁻³	5/5	7,9 x 10 ³
	10 ⁻⁴	3/5	
	10 ⁻⁵	0/5	
8	10 ⁻¹	5/5	23
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	2/5	5
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻²	1/5	20
	10 ⁻³	0/5	
	10 ⁻⁴	0/5	

^a Tubos positivos: com produção de gás e turvação. EC= caldo EC.

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

Anexo 12. Determinação presuntiva de *E. coli* através da técnica do Número Mais Provável (NMP) na horta de número 2 em 10 amostras de alface.

Amostras	Diluições	Tubos positivos ^a / tubos analisados EC	NMP/g ^b
1	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
2	10 ⁻²	0/5	<2
	10 ⁻³	0/5	
	10 ⁻⁴	0/5	
3	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
4	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	1/5	
	10 ⁻³	0/5	
5	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
6	10 ⁻¹	1/5	2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
7	10 ⁻³	5/5	7,9 x 10 ³
	10 ⁻⁴	3/5	
	10 ⁻⁵	0/5	
8	10 ⁻¹	4/5	13
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
9	10 ⁻¹	0/5	<2
	10 ⁻²	0/5	
	10 ⁻³	0/5	
10	10 ⁻²	1/5	20
	10 ⁻³	0/5	
	10 ⁻⁴	0/5	

^a Tubos positivos: confirmados em placas com meio Eosina Azul de Metileno (EMB).

^b Interpretação da tabela de NMP pelo Bacteriological Analytical Manual-FDA, 1984.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ERRATA

Acrescentar em Referências Bibliográficas:

DONNEMBERG, M. S. & KAPER, J. B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Immun. 60: 3953-3961.

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHIMIDT, H. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34:229-243.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. Journal Infection Disease. 151: 775-782.

MEAD, P. S. & GRIFFIN, P.M. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet. 352 (9135): 1207-1212, Oct 10.

PATON, A.W.; R. RATCLIFF; R.M. DOYLE; J. SEYMOUR-MURRAY; D. DAVOS; J.A. LANSER & J.C. PATON. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. Journal Clinical Microbiology. 34: 1622-1627.

SHERMAN, P.; F. COCKERILL, III; R. SONI & J. BRETON. 1991. Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to epithelial cells. Infect. Immun. 59:890-899.