

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS**

***ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM ALIMENTOS**

Neusely da Silva

Doutor em Ciências e Alimentos

Fumio Yokoya

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, para
obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos

Campinas, SP

2004

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

Si38e Silva, Neusely
Escherichia coli 0157:H7 em alimentos / Neusely da Silva. –
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.*Escherichia coli*. 2.Hortaliças. 3.Cloro. 4.Hipoclorito de
sódio. I.Yokoya, Fumio. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fumio Yokoya
(Orientador)

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
(Membro)

Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira
(Membro)

Prof. Dra Mariko Ueno
(Membro)

Prof. Dr. Tomomasa Yano
(Membro)

Prof. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Membro)

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Membro)

Dedico

Ao pessoal do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), onde esse trabalho foi desenvolvido.

Agradeço

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela orientação, paciência e compreensão.

À Fapesp pelo indispensável apoio financeiro.

Conteúdo

Resumo	1
Summary	3
Introdução e justificativa	5
Capítulo 1. Revisão da literatura	9
Introdução	10
Sorologia de <i>E. coli</i>	12
Patogenicidade de <i>E. coli</i>	14
Doenças provocadas pela <i>E. coli</i> Shiga Toxigênica (STEC)	17
Colite hemorrágica	17
Síndrome hemolítico-urêmica (HUS)	17
Púrpura trombocitopênica trombótica (PTT)	18
Sorótipos de <i>E. coli</i> Shiga toxigênica mais envolvidos em surtos	19
Fatores de virulência da <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	21
Toxinas shiga	21
Intimina	23
Plasmídio pO157	24
Enterotoxina termoestável EAST-1	25
Adesina Saa	25
Ecologia de <i>E. coli</i> O57:H7	26
Detecção de <i>E. coli</i> O57:H7 em alimentos	29
Métodos culturais de detecção	29
Enriquecimento seletivo	30
Plaqueamento seletivo diferencial	31
Confirmação sorológica	32
Confirmação bioquímica	33
Produção de verotoxinas	35

Métodos imunológicos de detecção	35
Imunoensaios enzimáticos (ELISAs)	35
Ensaio de imunoprecipitação	37
Separação imunomagnética (IMS)	38
Métodos moleculares baseados nos ácidos nucleicos	39
Sondas genéticas	39
Reação de polimerase em cadeia (PCR)	40
Referências Bibliográficas	43
Capítulo 2	
Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em hambúrguer produzido no Brasil	59
Capítulo 3.	
Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção	67
Capítulo 4.	
Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras	79
Conclusões	98

Resumo

Escherichia coli O157:H7 foi reconhecida oficialmente como patógeno de origem alimentar no início dos anos 80, quando ocorreram vários surtos, principalmente nos Estados Unidos, incluindo casos fatais. *E. coli* O157:H7 provoca uma colite hemorrágica grave, que pode agravar-se para um quadro de síndrome hemolítica urêmica (HUS) ou púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), com alta taxa de mortalidade. Os primeiros surtos reconhecidos foram provocados pelo consumo de produtos cárneos, principalmente hambúrguer, mas os vegetais são hoje reconhecidos como outro importante veículo da infecção. No Brasil são raros os dados sobre a ocorrência desse microrganismo em alimentos, havendo grande interesse das indústrias de alimentos e dos órgãos reguladores por informações sobre o assunto.

Na primeira etapa da pesquisa (Capítulo 2) foi feita uma avaliação da ocorrência de *E. coli* O157:H7 em 886 amostras de hambúrgueres produzidos por 8 frigoríficos localizados no sul e sudeste do Brasil, no período de janeiro a setembro de 1997. Não foi detectada a presença do patógeno em nenhuma das amostras analisadas, embora 17 (1,9%) tenha apresentado a presença de cepas de *E. coli* com aglutinação com o antisoro O157. Essas cepas não foram confirmadas por apresentar, na identificação posterior, fermentação positiva do sorbitol, incapacidade de aglutinar com antisoros de outras marcas comerciais e não produção de verotoxinas. Foi também observada uma alta taxa de falsos presuntivos com cepas de enterobactérias, tanto isoladas pelo método cultural quanto pelo kit de imunoensaio enzimático da 3M Company, utilizados na realização das análises. Essa alta taxa de falsos presuntivos deveu-se principalmente ao fato de a triagem inicial das cepas sorbitol negativas ter sido feita em Ágar Vermelho de Fenol Sorbitol MUG (PRS-MUG), que mostrou-se inadequado para essa finalidade.

A segunda fase da pesquisa (Capítulo 3) foi dedicada à avaliação dos métodos disponíveis para a análise de produtos cárneos. Foi verificada a ocorrência de *Escherichia coli*

O157:H7 em 340 amostras de produtos cárneos e ambiente industrial, provenientes de frigoríficos do sul e sudeste do Brasil, no período de abril/98 a abril/99. A presença de *E.coli* O157:H7 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas e os resultados da avaliação da sensibilidade dos métodos de detecção evidenciaram que tanto o método cultural quanto o método de imunoensaio da Neogen (Reveal *E.coli* O157) foram capazes de detectar a presença de *E.coli* O157:H7 (em cultura pura) em concentrações iniciais de menos de 0,5 Log UFC/ml do caldo de enriquecimento.

Na terceira etapa da pesquisa (Capítulo 4) foi feito um estudo da ocorrência de *E.coli* O157:H7 em vegetais que são normalmente consumidos crus no Brasil e uma avaliação da sua resistência aos sanitizantes disponíveis no mercado para desinfecção de verduras, equipamentos e utensílios, incluindo compostos clorados e compostos de amônio quaternário. Na avaliação da ocorrência em vegetais foram analisadas 869 amostras, não sendo detectada a presença do patógeno. Os imunoensaios utilizados nas análises (Reveal *E.coli* O157 Neogen e EHEC Test Kit 3M Company) apresentaram uma taxa de falsos resultados presuntivos 13,6 e 11,8%, respectivamente, não confirmados como *E.coli* O157 nos testes bioquímicos posteriores. Na avaliação da resistência aos sanitizantes pelo método 960.9 da AOAC, observou-se que os tratamentos com 100 e 200ppm de hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio e cloreto de benzalcônio/30s se mostraram eficazes contra *E.coli* O157:H7 ATCC 43890, promovendo mais de 5 reduções decimais nas populações alvo.

Assim, em resumo, no período de janeiro de 1997 a outubro de 1999 foram analisadas 2.095 amostras de alimentos (1.111 de produtos cárneos, 115 do ambiente industrial e 869 de vegetais), não sendo detectada a presença de *E. coli* O157:H7.

Summary

Escherichia coli O157:H7 was recognized as a foodborne pathogen at the beginning of the '80s, when several outbreaks occurred in the United States, including fatal cases. *E. coli* O157:H7 causes haemorrhagic colitis, which may result in haemolytic uraemic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), with a high fatality rate. Meat and meat products, mainly hamburgers, were involved in the initial outbreaks, but vegetables are now recognized as another important vehicle of infection. In Brazil, data about the occurrence of *E. coli* O157:H7 in foods are rare, but is of great interest for the food industry and regulatory agencies.

In the first step of the research (Chapter 2) the occurrence of *E. coli* O157:H7 was evaluated in 886 samples of hamburgers produced by 8 manufacturers in the south and southeast of Brazil, from January to September of 1997. The pathogen was not detected in any of the samples analysed, although 17 (1.9%) showed the presence of *E. coli* strains which presented agglutination with O157 antiserum. These strains were not confirmed, since they were shown, in the subsequent identification, to be fermentation positive for sorbitol, incapable of agglutination with the antisera of other commercial brands and non-producers of verocytotoxins. A high rate of false presumptive positive samples was observed with strains of enterobacteria, both when isolated by the culture method and when using the 3M enzymatic immuno-assay, which was used in these analyses. This high rate of false presumptive positives was probably due to the fact that the initial screening for sorbitol negative strains was carried out using Phenol Red Sorbitol MUG Agar (PRS-MUG), which had shown to be inadequate for this purpose.

The second step (Chapter 3) was dedicated to the evaluation of the analytical methods available for meat products analysis. The occurrence of *E. coli* O157:H7 was verified in 340 samples of meat products and industrial environment of meat manufactures from the South and Southeast regions of Brazil, from April, 1998 to April, 1999. The pathogen was

not detected in any of the samples analysed, and the sensibility evaluation of the studied detection methods, showed that both, culture and immuno-assay methods (Neogen Reveal *E.coli* O157) detected *E.coli* O157:H7 in pure culture in initial population levels of 0.5 Log CFU/ml of enrichment broth.

In the third step (Chapter 4), a study of *E.coli* O157:H7 occurrence in fresh vegetables that are usually consumed raw in Brazil was carried out as well as an evaluation of its resistance to the sanitizers available on the market for disinfection of green vegetables, equipment and utensils, including chlorine and quaternary ammonium compounds. In the evaluation of the occurrence in vegetables, 869 samples were analyzed, without the presence of the pathogen being detected. The immunoassay used in the analyses (Reveal *E.coli* O157 Neogen e EHEC Test Kit 3M Company) presented a false presumptive rate of 13,6 and 11,8%, respectively, not confirmed as *E.coli* O157 in the subsequent stages of identification. In the evaluation of the resistance to the sanitizers using the AOAC method 960.9 it was observed that the treatment with 100ppm and 200ppm of sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and benzalconium chloride/30s showed effectiveness against *E.coli* ATCC 11229 e *E.coli* O157:H7 ATCC 43890, with more than 5 decimal reductions over the population.

Introdução e justificativa

Esse trabalho foi desenvolvido como parte das atividades do Programa de Segurança Alimentar do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL/Campinas/SP), que contempla, dentre outras atividades, o monitoramento de patógenos emergentes em alimentos. Segurança Alimentar é um tema estratégico para o Brasil hoje, porque envolve não só o aspecto de saúde pública no mercado interno, mas também, e cada vez mais, o aspecto de competitividade do país no mercado externo. A partir de 1995, quando foi firmado o Acordo SPS (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures) da Organização Mundial do Comércio (OMC), esses dois aspectos se tornaram inseparáveis. O acordo objetiva impedir que, com a progressiva redução das barreiras tarifárias no comércio internacional, os países utilizem barreiras sanitárias e fitosanitárias como forma de proteger seus mercados. A principal decisão do acordo foi estabelecer que o livre comércio de alimentos entre países não pode ser impedida, exceto quando for comprovado que colocam em risco o Nível Adequado de Proteção ao Consumidor (Appropriate Level of Consumer Protection – ALOP), que cada país deve definir, com base na Análise de Risco do Codex Alimentarius.

A análise de risco é uma ferramenta de gerenciamento e controle de doenças de origem alimentar (DTAs), tanto dentro dos países como no mercado internacional. Foi desenvolvida pela FAO (Food and Agriculture Organization), OMS (Organização Mundial da Saúde) e Codex Alimentarius, envolvendo 3 aspectos básicos do controle de doenças: a Avaliação do Risco Microbiológico (Risk Assessment), o Gerenciamento do Risco (Risk

Management) e a Comunicação do Risco (Risk Communication). O Gerenciamento e a Comunicação do Risco são atividades predominantemente governamentais, exercidas pelas autoridades sanitárias. A Avaliação de Risco Microbiológico, primeira etapa desse processo, envolve tanto os órgãos governamentais quanto a comunidade científica, pois é uma sistemática que reúne e organiza os dados disponíveis sobre cada microrganismo patogênico, em cada tipo de alimento, para criar um modelo estruturado que permita fazer previsões sobre o efeito desse alimento sobre a saúde de uma dada população. Seu objetivo é auxiliar na tomada de decisões, permitindo antecipar o impacto de diferentes medidas de controle sobre a probabilidade de ocorrência de DTAs. Um exemplo: qual é a melhor opção para reduzir o risco de salmoneloses transmitidas pelos ovos? Medidas para erradicação de *Salmonella* nas aves? Exigência de pasteurização de todos os ovos antes da comercialização? Ou uma campanha para informar os consumidores do risco de consumir ovos mal cozidos?

A Avaliação de Risco Microbiológico começa a partir da identificação do perigo (hazard identification), ou seja, definição de qual microrganismo em qual alimento será objeto da avaliação. A etapa subsequente é a caracterização do perigo (hazard characterization), que reúne todos os dados sobre o comportamento do microrganismo no alimento, doenças provocadas, dose infectiva e outras características relevantes na transmissão de doenças. Deve ser também determinada a taxa de exposição da população a esse microrganismo (exposure assessment), através da análise de produtos, levantamento de dados da literatura e aplicação de modelos preditivos de crescimento ou morte, abrangendo toda a cadeia produtiva (da matéria prima ao consumidor final). Finalmente, todos esses dados são combinados na criação de um modelo matemático que permita caracterizar o risco (risk characterization), ou seja, estimar a probabilidade de ocorrência de DTAs. Caracterizado o risco, é possível que cada país estabeleça o Nível Apropriado de Proteção ao Consumidor, definindo padrões microbiológicos e implantando medidas para atingir esse grau de proteção.

Na Avaliação de Risco Microbiológico, o monitoramento de patógenos nos alimentos é uma atividade essencial para a determinação da taxa de exposição. No Brasil,

microrganismos cuja patogenicidade já está bem estabelecida são rotineiramente monitorados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), pelos Centros de Vigilância Sanitária (CVS) estaduais. O monitoramento de patógenos emergentes, ao contrário, é bastante dependente das universidades e centros de pesquisa, para que se acumulem os dados iniciais de prevalência e se estabeleçam os métodos mais adequados de análise.

Assim está ocorrendo com *E.coli* O157:H7, que foi pela primeira vez implicada em surto no ano de 1982 e, rapidamente, se tornou motivo de preocupação dos principais órgãos internacionais relacionados com a saúde pública. O número de DTAs cresceu vertiginosamente em vários países do mundo, em surtos explosivos com centenas de indivíduos afetados. No Brasil, quando esse trabalho foi iniciado, os dados sobre a ocorrência em alimentos eram praticamente inexistentes. Hoje, continuam escassos, considerando-se o volume da produção brasileira e a diversidade de condições em que operam as indústrias, nas diferentes regiões do país. Assim, consideramos plenamente justificados os objetivos do trabalho, apresentados a seguir.

Objetivos

1. Verificar a ocorrência de *E.coli* O157:H7 em hambúrguer produzido no Brasil para o mercado interno e externo.
2. Verificar a ocorrência de *E.coli* O157:H7 em outros produtos cárneos e no ambiente industrial.
3. Verificar a ocorrência de *E.coli* O157:H7 em vegetais consumidos na forma de saladas cruas.
4. Determinar o limite de sensibilidade dos métodos utilizados.
5. Verificar a eficácia de desinfetantes usados em restaurantes, cozinhas industriais e indústrias alimentícias contra *E.coli* O157:H7.

Capítulo 1

Revisão da literatura

INTRODUÇÃO

A existência de cepas patogênicas de *Escherichia coli* foi descoberta em 1980, quando se determinou sua associação com diarreias em bezerros. Estudos desenvolvidos nas décadas de 1920 e 1930 já sugeriam seu envolvimento com diarreias infantis, mas foi apenas na década de 1940 que o conceito de *E. coli* como agente etiológico de diarreia em humanos foi efetivamente aceito [29].

E. coli é um membro da família *Enterobacteriaceae*, que reúne as bactérias Gram negativas anaeróbias facultativas e oxidase negativas. As principais características que distinguem essa espécie dos demais membros da família são, segundo KRIEG & HOLT [58]:

a) O metabolismo fermentativo da glicose, que se dá por fermentação ácido mista e resulta em uma quantidade significativa de ácidos como produtos finais (ácido láctico, acético e fórmico). Essa característica é evidenciada no teste positivo de vermelho de metila (VM), que verifica se o pH final do meio de cultura atinge valores abaixo de 4,5. Consequentemente, o teste de Voges Proskauer (VP), que verifica a produção de butilenoglicol (butanodiol) como produto final de fermentação da glicose, é negativo para *E. coli*. Outra característica importante do metabolismo fermentativo é a capacidade de hidrolizar parte do ácido fórmico produzido, resultando em dióxido de carbono e hidrogênio (produção de gás). São raras as cepas anaerogênicas, que não produzem gás a partir da glicose.

b) As cepas de *E. coli* podem utilizar acetato, glicose, lactose e vários outros compostos como fonte de carbono, mas não utilizam o citrato, característica bastante explorada na identificação da espécie. A capacidade de fermentação da lactose com produção de gás, tanto a 35 quanto a 45°C, é amplamente utilizada na sua quantificação, através da análise de coliformes fecais pelo método do Número Mais Provável.

c) Caracteristicamente, *E. coli* produz indol e a enzima β -glicuronidase, mas não produz sulfeto de hidrogênio nem hidroliza a uréia. A β -glicuronidase é produzida por 96% das cepas, incluindo as anaerogênicas, mas não pelos outros membros da família

Enterobacteriaceae, exceto *Shigella* (44%) e *Salmonella* (29%). Um dos substratos mais utilizados para verificar a presença da β -glicuronidase é o 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG), composto não fluorescente que, quando degradado pela β -glicuronidase, resulta na 4-metilumbeliferona, fluorescente sob luz UV. O MUG ou seus similares cromogênicos (cujos produtos de reação são coloridos sob luz normal) têm sido amplamente utilizados numa nova geração de meios de cultura, para quantificação diferencial de *E. coli* em água e alimentos. Podem ser adicionados ao Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) ou ao Caldo *E. coli* (EC), para quantificação direta pelo método do NMP, ou ao Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), para quantificação em placas. O VRB contendo um substrato cromogênico da β -glicuronidase foi utilizado pela 3M Company no desenvolvimento do Petrifilm coliformes/*E. coli*, que permite a quantificação diferencial de *E. coli* e coliformes totais.

d) *E. coli*, assim como todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, não é uma bactéria esporogênica, logo, não é resistente aos tratamentos térmicos brandos como a pasteurização.

SOROLOGIA DE *E. COLI*

Segundo DESMACHELIER and GRAU [25], a distinção sorológica entre as cepas de *E. coli* enteropatogênica foi importante nos primeiros estudos, mostrando o predomínio de certos sorotipos nas ocorrências de diarreias infantis ou de “diarreia de verão”. A sorotipagem é baseada nas diferenças antigênicas encontrada em certas estruturas superficiais das células, particularmente o envelope celular ou cápsula (antígenos K), a parede celular (antígenos O) e os flagelos (antígenos H). Os antígenos de fímbrias formam um quarto sistema de sorotipagem, para as cepas que apresentam essas estruturas.

Os antígenos K foram originalmente descritos como parte do envelope celular que mascara o antígeno O, impedindo ou reduzindo sua aglutinação pelos antissoros O. Essa inibição pode ser evitada pelo aquecimento das células [82] e, baseado parcialmente na estabilidade térmica, 3 diferentes antígenos K foram inicialmente distinguidos (A, B e L). Essa divisão não é mais utilizada e hoje o antígeno K é definido como um polissacarídeo capsular ou microcapsular, independente do antígeno O, havendo mais de 70 grupos reconhecidos até o momento.

Os antígenos O têm sua base química na diversidade de polissacarídeos da parede celular das bactérias Gram negativas. A parede celular é composta de uma camada interna de peptidoglicano, seguida de uma dupla camada lipídica mais externa. Essa dupla camada lipídica apresenta uma face composta de lipoproteínas e fosfolipídios, conectada ao peptidoglicano e, no lado mais externo, uma face composta de lipopolissacarídeos (LPS), embebida na camada lipídica. Os lipopolissacarídeos, por sua vez, apresentam uma porção lipídica interna, chamada de lipídio A e, estendendo-se para fora da superfície da célula, uma camada polissacarídica intermediária (core) e outra camada polissacarídica externa, que constitui a região antigênica O. Essa região contém seqüências de 1 a 50 unidades repetidas de oligossacarídeos, ligados covalentemente ao polissacarídeo do core [15]. Os antígenos O são termoestáveis (100 ou 120°C/2h) e atualmente há mais de 170 grupos sorológicos reconhecidos. De acordo com MAURER *et al.* [68], essa diversidade é um reflexo das variações na sequência de DNA do operon *rfb*, que codifica as enzimas

responsáveis pela síntese, polimerização e ligação do antígeno O ao core. O número de genes presentes no operon *rfb* é variável e responde pela composição e complexidade do antígeno O nas cepas de *Salmonella* e *E. coli* [106]. Na *E. coli* O157 o operon *rfb* contém genes para enzimas que são exclusivas desse sorotipo [13] ou que, mesmo sendo comuns a outros sorotipos, apresentam divergências evolucionárias suficientes para servir de marcador molecular para a O157 [68].

Os antígenos H são derivados do flagelo das cepas móveis, sendo atualmente reconhecidos 53 grupos. São termossensíveis (não resistem à temperatura de 100°C/1h) e a proteína flagelar (flagelina, uma subunidade do filamento helicoidal que forma o flagelo) carrega os fatores antigênicos determinantes do grupo H. Os genes responsáveis pela sua codificação estão localizados no locus *fliC* [64, 65, 93] e, nas cepas de *Salmonella enterica* e *E. coli*, as regiões terminais da proteína são conservadas, enquanto a região central varia, dando origem aos grupos sorológicos específicos [56, 65, 86, 119].

PATOGENICIDADE DE *E. COLI*

Atualmente há 6 grupos de *E. coli* patogênicas reconhecidos: 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 2) *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), 4) *E. coli* enteroagregativa (EAggEC ou EAEC), 5) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e 6) *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) [25].

***E. coli* Enteropatogênica (EPEC).** Entende-se por EPEC, também conhecida como “attaching and effacing” *E. coli* (AEEC), a classe de *E. coli* pertencente a alguns sorogrupos epidemiologicamente associados a gastroenterites, que ocorrem predominantemente em crianças com menos de um ano de idade. Atualmente já existem dados indicando que adultos podem também apresentar essa síndrome. Essa classe de *E. coli* recebe frequentemente a denominação de *E. coli* enteropatogênica clássica, por terem sido as primeiras *E. coli* implicadas em diarreia. A doença causada por EPEC é uma gastroenterite, caracterizada por diarreia aquosa ou sanguinolenta. O mecanismo da diarreia ainda não está completamente elucidado, mas é decorrente da adesão do microrganismo ao epitélio do intestino e subsequente destruição das microvilosidades, resultando em alteração física da integridade do intestino [85].

***E. coli* Enterotoxigênica (ETEC).** Entende-se por ETEC a classe de *Escherichia coli* associada à doença diarreica em indivíduos de todas as idades. A diarreia é consequência da ação de enterotoxinas produzidas por essas bactérias no intestino do indivíduo infectado. No momento são conhecidas pelo menos duas enterotoxinas diferentes, com pelo menos duas variantes cada. Todas agem estimulando enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal. Esse estímulo resulta em uma menor absorção de sódio pelas células das microvilosidades intestinais e maior excreção de cloretos e bicarbonatos, com consequente acúmulo de líquido no lúmen intestinal e diarreia. Devido a ação das enterotoxinas o sintoma mais característico da doença causada por ETEC é a diarreia aquosa abundante, semelhante à da cólera. Outros sintomas incluem dores abdominais, febre baixa, náuseas e mal-estar geral. Nos países em desenvolvimento, a ETEC está associada à diarreia conhecida como diarreia dos viajantes [85, 107].

***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC).** Entende-se por EIEC a classe de *Escherichia coli* que causa uma infecção intestinal muito semelhante à causada por *Shigella*. A infecção é resultante da penetração das bactérias nas células da mucosa intestinal, e conseqüente penetração nas células adjacentes. Há intensa proliferação dentro dessas células, que leva a sua morte. Não há produção de nenhum tipo de toxina. Como nas shigeloses, a infecção causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do colon (intestino grosso). Clinicamente, as infecções se manifestam por diarreia sanguinolenta ou não, com a presença de leucócitos e muco, frequentemente acompanhada de dores abdominais e febre. As infecções por EIEC são mais frequentes em crianças maiores de dois anos e em adultos. A característica de invasividade, tanto da EIEC como da *Shigella*, está associada à presença de um plasmídeo [85].

***E. coli* Enteroagregativa (EAggEC ou EAEC).** Entende-se por EAEC a classe de *Escherichia coli* associada à diarreia aquosa. O mecanismo pelo qual a doença é provocada ainda não é conhecido, mas a autópsia de crianças atingidas mostrou lesões no íleo [76]. A principal característica das cepas EAggEC é a produção de um padrão de aderência exclusivo em células hepteliais HEp-2, denominado adesão agregativa. Neste padrão, as bactérias dispõem-se lado a lado, formando agregados heterogêneos que lembram tijolos empilhados, ou distribuindo-se em forma de cordões, tanto nas superfícies celulares como nas lamínulas de suporte, em regiões livres de células [2]. As cepas EAggEC carregam ainda um plasmídeo de 60 Mda, que codifica a produção de uma toxina termoestável (EAST1), também é encontrado entre as cepas ETEC e EHEC [101]. A superfície das EAggEC é hidrofóbica e essa característica parece estar associada à uma camada superficial densa em elétrons e à presença de uma proteína de 38 kDa não encontrada em qualquer outra cepa de *E. coli* [116].

***E. coli* de Aderência Difusa (DAEC).** As cepas do grupo DAEC podem ser isoladas tanto de indivíduos sãos como de pessoas com diarreia, sendo mais importantes em crianças de 4 a 5 anos. O principal sintoma é a diarreia aquosa, sem sangue e sem leucócitos. As cepas DAEC não formam microcolônias quando aderem às células Hep-2. Pouco se sabe sobre seu mecanismo de patogenicidade, porém, foi caracterizada uma fímbria de

superfície, conhecida como F1845, envolvida no fenômeno de aderência difusa. Os genes que codificam esta fímbria podem estar localizados no cromossomo ou em um plásmidio. O fenômeno de aderência difusa também parece estar associado a uma proteína de 100 kDa da membrana externa, encontrado em uma cepa do sorotipo 0126:H27. Os genes que codificam essa proteína já foram sequenciados, porém, foram encontrados em apenas algumas cepas DAEC isoladas. Ao realizar-se ensaios “in vitro” em células CaCo e Hep-2, as cepas DAEC apresentam a capacidade de induzir a formação de estruturas protuberantes, semelhantes a dedos, que conferem proteção às células bacterianas. A presença dessas estruturas, entretanto, ainda não foi demonstrada “in vivo” [97].

***E. coli* Shiga Toxigênica (STEC).** Também chamadas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ou de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC), essa classe compreende as cepas de *E. coli* produtora de verotoxinas (incluindo a *E. coli* O157:H7), associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. A síndrome é decorrente da adesão às células epiteliais intestinais e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infectado. No momento são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes, chamadas de verotoxinas (VT I e II) devido ao seu efeito citopático irreversível sobre células Vero (linhagem de células do rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) [31]. Também são chamadas de toxinas shiga ou “shiga-like” toxinas (SLT I e II), devido à semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I [118].

DOENÇAS PROVOCADAS PELA *E. COLI* SHIGA TOXIGÊNICA (STEC)

Há atualmente cerca de 200 sorotipos de *E. coli* produtoras de verotoxinas [121], responsáveis por um amplo espectro de doenças, que vão de diarreias brandas à colite hemorrágica e doenças mais graves como a síndrome hemolítico-urêmica (HUS) e a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) [31].

Colite hemorrágica

De acordo com a FDA/CFSAN [37], a colite hemorrágica provocada pelas cepas STEC é caracterizada por dores abdominais severas e diarreia, inicialmente aquosa e posteriormente sanguinolenta. Ocasionalmente ocorre vômito ou febre baixa. A doença é geralmente auto-limitada, durando cerca de 8 dias e, em alguns indivíduos, apresenta apenas diarreia aquosa. A dose infectiva é ainda desconhecida mas, de acordo com dados obtidos de surtos, parece ser similar à da *Shigella* (10 células). Outras fontes relatam valores na faixa de 10 a 10.000 células por grama ou mililitro do produto consumido [18, 62]. A população alvo pode ser de qualquer faixa etária, sendo maiores os riscos para idosos, crianças menores de 5 anos, indivíduos imunodeprimidos ou com problemas renais [118]. A transmissão pode ocorrer por contato direto (contato com gado infectado ou suas fezes e contato pessoa-pessoa) ou indireto, através do consumo de alimentos contaminados [114].

Síndrome hemolítico-urêmica (HUS)

De acordo com a literatura, cerca de 10% dos casos de colite hemorrágica podem agravar-se, provocando um quadro conhecido como síndrome hemolítico-urêmica (HUS), geralmente diagnosticado de 2 a 14 dias após o início da diarreia. É caracterizada pelo desenvolvimento de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal aguda e manifestações do sistema nervoso central como letargia, dor de cabeça severa, convulsões e encefalopatia [31]. A anemia hemolítica decorre de um baixo número de glóbulos vermelhos no sangue, resultante da sua desintegração prematura no interior dos vasos sangüíneos. A hemoglobina não aproveitada é filtrada e expelida pelos rins, deixando

a urina escura. Se o volume de destruição for mínimo, o resultado será a letargia; se for aguda, a doença poderá acarretar a morte [32]. A trombocitopenia decorre da redução do número de plaquetas no sangue, causada por distúrbios na sua produção, distribuição ou destruição. Provoca púrpura, que são manchas na pele, ocasionadas pelo sangramento de pequenos vasos sangüíneos próximos da superfície. Quando as manchas de púrpura são muito pequenas são chamadas de petéquias, quando são grandes, equimoses [33, 60]. A insuficiência renal afeta a grande maioria dos pacientes de HUS, cerca de 25% deles apresentando hipertensão arterial e manifestações neurológicas como irritabilidade, letargia, convulsões e coma. Alterações em outros órgãos como o pâncreas e o coração também têm sido relatadas com bastante frequência [31].

A HUS pode ocorrer em pacientes de qualquer faixa etária, mas crianças e idosos parecem ser mais suscetíveis. No Brasil a incidência não é conhecida, mas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, há vários anos tem sido a causa mais comum de insuficiência renal em crianças na Argentina, onde cerca de 250 novos casos são relatados anualmente [120]. A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 2 a 7%, mas em alguns surtos, especialmente entre os idosos, chega a 50% [120]. Outra consequência grave desta doença é o número significativo de sobreviventes que apresentam seqüelas permanentes, como insuficiência renal crônica, hipertensão e problemas neurológicos [87]. Como não há uma terapia específica para a HUS, a maioria dos pacientes requer tratamento prolongado, envolvendo diálise, transfusão de sangue ou transplante dos rins [114, 118], com custos significativos [120].

Púrpura trombocitopênica trombótica (PTT)

PTT é outra complicação extra intestinal que pode ocorrer nas infecções causadas pelas cepas EHEC. É uma doença mais rara, caracterizada por cinco sinais e sintomas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, sinais neurológicos, febre e alterações renais. Os sintomas neurológicos podem ser cefaléia, confusão, afasia e alterações da consciência (da letargia ao coma) [96]. A TTP inclui todas as características da HUS, embora o dano renal seja menos severo e o envolvimento neurológico mais proeminente. Geralmente é diagnosticada em adultos [90].

SOROTIPOS DE *E. COLI* SHIGA TOXIGÊNICA MAIS ENVOLVIDOS EM SURTOS

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde [122], o sorotipo O157:H7 é o mais frequentemente associado a surtos relatados e documentados de colite hemorrágica e HUS. Há, entretanto, indicações claras de que o envolvimento de cepas de outros sorotipos está crescendo. Os dados epidemiológicos disponíveis sugerem que o sorotipo O157:H7 é predominante nos Estados Unidos, Canada, Reino Unido e Japão, enquanto na América do Sul, Austrália e Europa continental os sorotipos não-O157 são mais comuns.

Dados desse mesmo relatório indicam que, em indivíduos com diarreia, as cepas não-O157 têm sido isoladas com frequência média 4 vezes maior do que a O157, embora tenha sido observada uma grande variação nessa proporção, de uma região geográfica para outra. Nos Estados Unidos, ao contrário, a O157 é encontrada com frequência duas vezes maior do que as demais STEC. Com relação ao casos de HUS estudados em todo o primeiro mundo, as cepas não-O157 responderam, em média, por 25% das cepas STEC implicadas nas ocorrências. Também nesse caso, essa proporção apresentou grandes diferenças de uma região para outra, variando de 7 a 90% [122].

No Brasil, levantando-se apenas os casos de diarreia em humanos, a frequência de isolamento de cepas STEC é muito baixa [17, 46, 54], porém, comparável à observada em outras partes do mundo [12, 52, 92]. Desde 1989 o sorotipo O111:NM é o mais frequente em nosso ambiente [46], porém, dois casos de doença associados com os sorotipos O157:H7 e O26:H11 já foram identificados [47, 53]. Em reservatórios animais, ao contrário, as cepas STEC são bastante comuns [19, 20], embora poucos dos sorotipos isolados sejam reconhecidos como patógenos.

Um fato importante a destacar é que, embora o isolamento de cepas não-O157 seja bastante comum em todo o mundo, nem todos os sorotipos STEC ocorrem com a mesma frequência. Dentre os quase 200 existentes, cerca de 50 têm sido isolados de pacientes [75] e, em muitos casos, não é certo que tenham sido a causa da doença, sendo também encontradas

em indivíduos sãos. Além disso, há vários relatos de pacientes apresentando cepas não O-157 nas fezes e, ao mesmo tempo, altos níveis de anticorpos contra o antígeno O157 [112], sugerindo a presença desse sorotipo como causa dos sintomas, embora não detectado.

O fato é que distinguir as cepas STEC verdadeiramente patogênicas não é tão simples, uma vez que a mera produção das verotoxinas não é suficiente para conferir virulência, havendo outros fatores envolvidos. Isso teve reflexos sobre a nomenclatura desse grupo, sendo reconhecida atualmente a seguinte situação [75]: STEC e VTEC são termos equivalentes e ambos se referem a todas as cepas de *E. coli* que produzem uma ou mais verotoxinas. Como não está claro se a simples presença dos genes que codificam essas toxinas é capaz de conferir patogênicidade, na ausência de outros fatores de virulência (descritos no próximo item, abaixo), o termo *E. coli* enterohemorrhagica (EHEC) fica reservado às cepas que provocam colite hemorrágica, HUS ou PTT, produzem toxinas shiga, aderem às células do epitélio intestinal, provocando lesões A/E (“attaching and effacing”) e possuem o plasmídeo pO157, associado à produção de enterohemolisinas e potenciais fatores de aderência. Dessa forma, EHEC denota um subgrupo da classe STEC e inclui uma conotação clínica não extensiva a todo o grupo. De acordo com essa definição, todas as cepas EHEC são patogênicas, sendo seu principal representante o sorotipo O157. Os outros sorotipos que têm sido associados às manifestações clínicas mais graves são o O111:H8/NM (predominante na Austrália), o O26:H11, o O103:H2 e o O113:H21 [31, 45, 122].

FATORES DE VIRULÊNCIA DA *E. COLI* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)

Nos últimos anos houve um avanço significativo na compreensão da patogênese da infecção causada pelas cepas EHEC, embora ainda não completamente elucidado. De acordo com COOCKSON [23], cepas patogênicas de *E. coli*, em geral, podem ser subdivididas de acordo com os fatores de virulência envolvidos nas manifestações clínicas. Vários desses fatores foram adquiridos por mecanismos evolucionários, envolvendo a transferência horizontal de material genético. Nas EHEC isso pode ser observado na frequência com que os fatores de virulência (descritos abaixo) são mediados por plasmídios e bacteriófagos.

Toxinas shiga

O principal fator de virulência das EHEC é a produção das toxinas shiga (Stx), extremamente potentes e responsáveis por muitos dos sintomas observados nos pacientes infectados [75]. A família Stx apresenta dois grupos principais, imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas, chamados de Stx1 e Stx2 (ou VT1 e VT2). Uma cepa EHEC pode expressar apenas a Stx1, apenas a Stx2, ambas ou múltiplas formas da Stx2. Dados epidemiológicos sugerem que a Stx2 é mais importante que a Stx1 no desenvolvimento de HUS [44]. Vários relatos indicam que as cepas de *E. coli* O157:H7 que expressam apenas a Stx2 têm maior probabilidade de provocar HUS do que as que expressam apenas a Stx1 ou, curiosamente, ambas [91].

As toxinas shiga pertencem ao grupo das toxinas tipo A/B, isto é, apresentam uma subunidade do tipo A, que é enzimática, e 5 subunidades do tipo B, que são oligômeros constituídos de 5 proteínas idênticas [105]. Essa estrutura básica A/B é comum a todas as toxinas shiga e a Stx1 da EHEC é praticamente idêntica à Stx da *Shigella dysenteriae* I, algumas cepas apresentando diferença em apenas um resíduo e outras não apresentando qualquer variação na sequência [77, 110]. Entre si, a Stx1 e Stx2 da EHEC apresentam 55% de homologia na sequência da subunidade A e 57% na sequência da subunidade B [55]. A estrutura da Stx1 é altamente conservada entre as cepas EHEC mas há variações na

sequência da Stx2. Essas variantes são designadas Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e, etc., e a designação dessas múltiplas formas é totalmente intercambiável entre a nomenclatura Stx ou VT utilizada [16].

As subunidades B mediam a ligação da toxina à célula hospedeira, através de receptores específicos. Na maioria dos casos esse receptor é a globotriacilceramida (Gb3), um glicolípido presente na superfície das células eucarióticas, enquanto a variante Stx2 utiliza o Gb4 como receptor. Uma vez ligada à célula, a subunidade A da toxina, que é uma N-glicosidase, remove um único resíduo de adenina do rRNA 28S, inibindo a síntese de proteínas. Essa inibição leva à morte de células endoteliais renais, células epiteliais intestinais, células Vero, células HeLa ou qualquer outra que contenha Gb3 (ou Gb4 no caso da Stx2e) [75].

Também já foi bem documentada, “in vivo” e “in vitro”, a indução de apoptose pelas subunidades B das Stx. De acordo com VASCONCELOS [115], apoptose é um tipo de morte celular programada, que requer energia e síntese protéica para a sua execução. Essa “autodestruição celular”, quando ocorre naturalmente, é um fenômeno desejável e necessário, que participa na formação dos órgãos e que persiste em alguns sistemas adultos como a pele e o sistema imunológico. É um processo rápido, que se completa em aproximadamente 3 horas e não é sincronizado por todo o órgão. Portanto, diferentes estágios de apoptose coexistem em diversas secções dos tecidos e, devido à taxa rápida de destruição celular, não é necessário mais do que 2 a 3% das células em apoptose, em determinado momento, para que se obtenha uma regressão de até 25% do tecido por dia. A subunidade B purificada das toxinas shiga já se mostrou capaz de matar células epiteliais, sugerindo-se que sua ligação aos receptores Gb3 pode ativar um sinal de transdução que culmina com a apoptose. A inibição da síntese de proteína provavelmente induz um sinergismo com a via dependente de Gb3, evitando a síntese de inibidores da apoptose. Embora estas toxinas sejam citotóxicas “in vitro”, o significado da indução “in vivo” ainda não está claro. As células renais e do sistema nervoso central são ricas em receptores Gb3, o que poderia explicar a localização específica das seqüelas da infecção. Os macrófagos, que não expressam Gb3, não são suscetíveis a estas toxinas [74].

Os genes responsáveis pela codificação das subunidades A e B das toxinas shiga da EHEC (*stxAB*, também chamados de *sltAB* ou *vtxAB* na literatura) estão organizados em operons, codificando primeiro a subunidade A e depois a subunidade B. Os da Stx1 são carreados por bacteriófagos e os da Stx2 podem ser encontrados tanto em bacteriófagos como no cromossomo [75, 87, 105]. A produção da Stx1 é reprimida pelo ferro e pela redução da temperatura, mas a expressão da Stx2 não é afetada por esses fatores [75].

Intimina

As cepas EHEC são capazes de aderir fortemente às células epiteliais, através da produção de uma proteína superficial (denominada intimina) e de um receptor (Tir) que, uma vez secretado na célula hospedeira, aloja-se na membrana e serve como ponto de ancoragem para a intimina [6, 22, 27, 28, 35]. Esse processo provoca na célula hospedeira o que se chama de lesões A/E (“attaching and effacing”), causadas pela deformação de algumas microvilosidades, desestruturação de outras e formação de uma estrutura em pedestal, na qual a membrana epitelial envolve a bactéria [72, 98]. A intimina e o Tir são codificados pelos genes *eae* e *tir*, respectivamente, presentes numa região do DNA chamada LEE (“locus of enterocyte effacement”) [1]. A sequência de aminoácidos das intiminas produzidas pelas diferentes cepas EHEC são altamente divergentes na extremidade carboxila e, com base nessas variações, são classificadas em 5 subgrupos (α , β , γ , δ , and ϵ). Na *E. coli* O 157:H7 ocorre o tipo γ [42].

Existe uma forte associação entre a produção da intimina e a ocorrência de colite hemorrágica e HUS [24, 87]. Diversos estudos mostram que gene *eae* é muito comum dentre as cepas isoladas de pacientes com essas doenças, mas dentre as cepas isoladas de reservatórios animais, só é frequente nos sorotipos reconhecidos como patógenos [5, 10, 11, 63, 100, 123].

Plasmídio pO157

As cepas O157:H7 e a maioria dos demais sorotipos da STEC isoladas de humanos apresentam um plasmídio altamente conservado, chamado pO157 [9, 61], cujo tamanho

varia de 93,6 a 104 kb [104]. Também relatado na literatura como plasmídio 60-MDa [72, 87, 95], esse plasmídio contém o gene *ehxA* (ou *hlyA*), que codifica uma hemolisina, chamada de enterohemolisina ou hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC Hly) [72, 95, 102]. A hemolisina pertence à família RTX (repeat in toxin) de citolisinas formadoras de poros, também encontradas em cepas de *E. coli* uropatogênica, *Pasteurella haemolytica* e outros patógenos humanos e animais [7]. O gene *ehxA* presente no plasmídio 60-MDa apresenta 60% de homologia com o gene *hlyA*, envolvido na codificação da hemolisina da *E. coli* uropatogênica [7, 103].

O papel da enterohemolisina ainda é objeto de especulação, podendo estar associado à lise de eritrócitos “in vivo”, liberando heme e hemoglobina [43, 75]. Isso estimularia o crescimento da O157:H7, porque essas cepas apresentam um sistema de transporte de ferro altamente especializado, que permite utilizar heme e hemoglobina como fonte de ferro [59, 73, 113]. Havendo limitação de ferro, uma proteína de membrana de 69-kDa é sintetizada, codificada pelo gene *chuA* (*E. coli* heme utilization gene). Um gene homólogo ao *chuA* é encontrado em cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1 mas não em qualquer outra *Shigella* ou *E. coli* produtora de shiga toxina [73, 113].

O pO157 também codifica outros produtos potencialmente patogênicos, dentre eles encontrando-se a) uma proteína (KatP) altamente homóloga à família bifuncional catalase-peroxidase, b) uma serina protease (EspP) capaz de clivar a pepsina e o fator V de coagulação humana, c) um conjunto de 13 genes (*etpC-O*), altamente homólogo ao que codifica a via de secreção tipo II das bactérias Gram negativas e está envolvido na secreção de fatores patogênicos, d) uma toxina (ToxB) que apresenta 20% de homologia com a toxina B de *Clostridium difficile*, reconhecido agente de enterocolite induzida por antibióticos e e) um gene (*tagA*), que codifica uma lipoproteína de membrana e que pode estar relacionado à patogenicidade, porque é homólogo ao encontrado nas cepas de *Vibrio cholerae* [43, 49, 66].

Enterotoxina termoestável EAST-1

Outro fator de virulência identificado nos sorotipos O157:H7, O26:H11 e alguns outros EHEC é a presença da EAST-1, enterotoxina termoestável característica da *E. coli* enteroagregativa. A EAST-1 é codificada pelo gene *astA* e um estudo de SAVARINO *et al.* [101] detectou esse gene em 75 cepas O157:H7 avaliadas (100%), usualmente com duas cópias no cromossomo. O gene também foi encontrado em 8 de 9 cepas O26:H11 (89%) e em 12 de 23 outras cepas não-O157 (52%) analisadas. O significado dessa toxina na patogenicidade da EHEC é desconhecido mas tem-se sugerido que esteja envolvida com a diarreia aquosa que se observa nos primeiros estágios da infecção [87].

Adesina Saa

A adesina Saa também é outro fator de virulência recentemente identificado, detectada em cepas *eae* negativas de STEC. O gene *saa*, que codifica esta adesina, apresenta localização plasmidial. Este fator de virulência está associado com a adesão da bactéria e, em culturas de células, apresenta um padrão de aderência semi-localizada. Cepas contendo este gene foram isoladas de pacientes com HUS [89] e sua presença está sendo utilizada como um marcador de virulência em testes diagnósticos [88].

ECOLOGIA DE *E. COLI* O157:H7

O trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas entero-hemorrágicas de *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O157:NM. Nesse tipo de animais, a incidência em fezes varia na faixa de 0 a 10%, conforme mostrado no Tabela 1, uma variação ampla que pode ser devida à diferenças na sensibilidade dos métodos de detecção empregados [99], embora seja também relacionada com a idade dos animais, que apresentam incidência maior quando jovens. Em suínos e aves, a presença parece não ser comum, embora já tenha sido isolada do intestino desse tipo de animal [69].

Tabela 1. Dados de ocorrência de *E. coli* O157:H7 em fezes de bovinos e ovinos em diferentes países [25].

País	Animal	Nº amostras	% positivos
Canada	Vacas leiteiras	886	0,5%
	Bezerros leiteiros com menos de 3 meses	592	1,5%
Inglaterra	Bovinos	2.103	4%
	Rebanho leiteiro implicado em surtos	105	9,5%
	Ovinos	700	2,6%
Alemanha	Touros	212	0,9%
	Vacas leiteiras	47	0
Escócia	Bovinos	1247	0,4%
	Ovinos	450	0
Espanha	Bezerros com diarreia	78	1,3%
Estados Unidos	Vacas leiteiras adultas	662	0,15%
	Novilhas leiteiras	394	3%
	Gado leiteiro	351	6,8%
	Ovinos	105	12,4%

Já foram incriminados em surtos, dentre outros alimentos, a carne bovina mal-cozida e outros produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres e salsichas tipo “hot-dog”), o leite cru, os vegetais (especialmente aqueles consumidos crus), os molhos preparados para saladas, a maionese e o suco de maçã. No geral, pode-se dizer que a carne bovina é uma das principais fontes potenciais de *E. coli* O157:H7, uma vez que o trato gastrointestinal de bovinos é o reservatório desses microrganismos [57]. Dados levantados por DESMARCHELIER & GRAU [25] revelaram contaminação em 0 a 3,7% das amostras de carne testadas em vários países do mundo (Tabela 2) e, segundo o USDA [114], a contaminação (cruzada), se dá na hora do abate, se houver contato das vísceras com a carne e com a superfície dos equipamentos e utensílios da planta de processamento.

Tabela 2. Dados de ocorrência de *E. coli* O157:H7 em carne e leite [25].

Alimento	Nº amostras	% positivas
Carcaças de bovinos	2.081	0,2%
Carne bovina moída	107	2,8%
	164	3,7%
	1.000	0
Carne de porco	264	1,5%
Carne de porco moída	260	0
Carne de carneiro	205	2%
Aves	263	1,5%
	300	0
Leite cru	603	0
	115	10%

A carne bovina moída, de maneira especial, tem sido o principal agente de surtos registrados nos Estados Unidos e outros países da Europa, presumindo-se que a operação de moagem transfira os microrganismos da superfície para todo o interior da massa de carne, aumentando assim a área de contato para o desenvolvimento bacteriano. Segundo KNIGHT

[57], pesquisas em supermercados americanos revelaram que *E. coli* O157:H7 está presente em 1 a 2,5% das amostras de carne testadas, embora exista a possibilidade de a contaminação ter ocorrido no próprio ponto de venda. O Programa de Monitoramento do FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture) coletou, de 1994 a 2001, quase 100.000 amostras de produtos de carne bovina moída em fábricas e pontos de venda nos Estados Unidos, encontrando contaminação em 0,36% (Tabela 3). Nesse período a porcentagem de amostras contaminadas aumentou progressivamente, passando de 0,05% em 1995 para 0,85% em 2000/2001 [41].

Tabela 3. Dados de ocorrência de *E.coli* O157:H7 em produtos de carne bovina moída crua nos Estados Unidos, determinada no Programa de Monitoramento do FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture) no período de 1994 a 2001 [41].

Ano	Número de amostras analisadas	Número de amostras positivas para <i>E.coli</i> O157:H7
1994	1.782	0
1995	10.814	6 (0,05%)
1996	11.442	8 (0,07%)
1997	12.130	8 (0,07%)
1998	16.160	28 (0,17%)
1999	15.572	64 (0,41%)
2000	12.748	109 (0,85%)
2001	14.018	118 (0,84%)
Total	94.666	341 (0,36%)

DETECÇÃO DE *E. COLI* O157:H7 EM ALIMENTOS

Há basicamente 3 tipos de métodos para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos: os métodos culturais clássicos, com várias etapas de subcultura, os métodos imunológicos, disponíveis comercialmente na forma de kits completos e os métodos moleculares, particularmente os baseados na reação de polimerase em cadeia (PCR).

No desenvolvimento desses métodos são exploradas as principais características que distinguem o sorotipo O157:H7 das demais cepas de *E. coli*, que são [67, 69, 79, 107]: a) fermentação do sorbitol negativa, enquanto 80 a 93% das outras *E. coli* são positivas, b) produção da enzima β -glicuronidase negativa, enquanto 92 a 96% das demais são positivas, c) crescimento pobre ou nulo a 44-45°C, d) presença do gene *eae* (attaching and effacing gene), e) presença do plasmídeo pO157.

MÉTODOS CULTURAIS DE DETECÇÃO

Os métodos culturais apresentam basicamente 5 etapas – enriquecimento seletivo, plaqueamento diferencial, confirmação sorológica e bioquímica e confirmação da produção de verotoxinas. A principal diferença entre eles são a seleção dos meios de cultura no enriquecimento e plaqueamento seletivo diferencial e a seleção das provas bioquímicas utilizadas na confirmação. Os mais utilizados são o da Food and Drug Administration (FDA) [36] e o do Food Safety and Inspection Service (FSIS) do United States Department of Agriculture (USDA) [26], descritos no Tabela 4.

Tabela 4. Métodos culturais de detecção *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos recomendados pela FDA (Food and Drug Administration) e USDA (United States Department of Agriculture).

Método	Enriquecimento seletivo	Plaqueamento seletivo diferencial	Confirmação preliminar	Confirmação definitiva
FDA (BAM) ¹	EEB - 37°C/6h (agitação) + 18h sem agitação	TC-SMAC - 37°C/24h	Indol (+) e sorologia O157	API 20E ou VITEK (BioMerieux) - sorologia H7 e verotoxinas
USDA/FSIS (MLG) ²	mECn 35°C/18-24h	MSA-BCIG – 42°C/24h	EMB e PRS-MUG 35°C/18h Sorologia O157	TSI, Indol, VM, VP, citrato, sorbitol, celobiose, ornitina e lisina descarboxilase, crescimento em caldo descarboxilase base e motilidade – sorologia H7 e verotoxinas

¹ Food and Drug Administration - Bacteriological Analytical Manual, 8th Ed., Revision A.[36].

² United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service - Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd Ed. [26].
Observação: essa metodologia foi utilizada até setembro de 1999, quando foi substituída por um método imunológico de detecção.

EEB = EHEC Enrichment Broth (Caldo Trypticase de Soja suplementado com 0,05mg/l de cefixima, 10mg/l de cefsulodina e 8mg/l de vancomicina).

EMB = Eosin Methylene Blue Agar Levine (comercial).

HC = Hemorrhagic Colitis Agar (20g/l Triptona, 1,12g/l sais biliares N° 3, 5g/l NaCl, 20g/l sorbitol, 0,1g/l MUG, 0,015g/l púrpura de bromocresol, 15g/l Agar).

mECn = Modified EC Novobiocin Broth (20g/l triptona, 5g/l lactose, 1,12g/l sais biliares N° 3, 4g/l K₂HPO₄, 1,5g/l KH₂PO₄, 5g/l NaCl e 20mg/l novobiocina sódica).

MSA-BCIG = MacConkey Sorbitol Agar suplementado com 0,1g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glicuronídeo.

m-TSB = Modified Trypticase Soy Broth (Caldo TSB suplementado com 1,5g/l de sais biliares N° 3, 20mg/l de novobiocina sódica e 1,5g/l de fosfato dipotássico).

PRS-MUG = Phenol Red Sorbitol MUG Agar (Base Ágar Vermelho de Fenol suplementado com 0,005% de 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronídeo e 0,5% de sorbitol).

SMAC = Sorbitol MacConkey Agar (comercial)

TC-SMAC = Tellurite Cefixime Sorbitol MacConkey Agar (Ágar MacConkey Sorbitol suplementado com 2,5mg/l de telurito de potássio e 0,05mg/l de cefixima).

Enriquecimento seletivo

O meio mais amplamente utilizado para o enriquecimento seletivo de *E. coli* O157:H7 é Caldo EC Modificado Novobiocina (mECn) incubado a 35°C/18-24h, conforme recomendado na 3^o edição (1998) do MLG (Microbiology Laboratory Guidebook) do FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture) [26]. A composição inclui triptona (20g/l), lactose (5g/l), sais biliares N° 3 (1,12g/l),

K_2HPO_4 (4g/l), KH_2PO_4 (1,5g/l), NaCl (5g/l) e novobiocina sódica (20mg/l). As diferenças em relação ao Caldo EC são, além da adição da novobiocina sódica, a redução da quantidade de sais biliares (de 1,50 para 1,12g/l) e a substituição da triptose pela triptona.

A FDA recomenda o Caldo EEB (EHEC Enrichment Broth), que é o Caldo Trypticase de Soja (TSB) suplementado com 0,05mg/l cefixima, 10mg/l cefsulodina e 8mg/l vancomicina, incubado a 37°C por 6 horas sob agitação e 18 horas adicionais em incubadora estática [51].

Outras alternativas recomendadas são o Caldo Trypticase de Soja suplementado com 1,5g/l sais biliares N° 3, 20mg/l novobiocina sódica e 1,5g/l fosfato dipotássico (mTSB), incubado a 37°C/24h [30], o caldo mTSB suplementado com acriflavina e hidrolizado ácido de caseína [84], a Água Peptonada Tamponada suplementada com vancomicina, cefsulodina e cefixima (BPW-VCC), incubação a 37°C/6h [21] e o caldo TSB no lugar da Água Peptonada Tamponada, suplementado com esses mesmos antibióticos, incubação a 37°C/6h [118].

Plaqueamento seletivo diferencial

O meio mais amplamente utilizado para o plaqueamento seletivo diferencial é Ágar MacConkey Sorbitol (MSA), meio seletivo para enterobactérias que diferencia as cepas de *E. coli* O157:H7 através da não fermentação do sorbitol (colônias brancas) após 18-24h de incubação a 35 ou a 42°C. Mais recentemente têm sido introduzidas nesse meio uma série de modificações, incorporando componentes para aumentar sua seletividade ou explorar características fenotípicas típicas das cepas de *E. coli* O157:H7. A FDA recomenda o uso do TC-SMAC, que é o Ágar MacConkey Sorbitol suplementado com telurito de potássio (2,5mg/l) e cefixima (0,05mg/l) [51], para inibir *Proteus* e outros gêneros de enterobactérias não fermentadores do sorbitol, como *Providencia* e *Aeromonas* [124]. A 3ª edição (1998) do MLG FSIS/USDA [26] recomenda o uso do MSA-BCIG, que é o Ágar MacConkey Sorbitol suplementado com 0,1g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicuronídeo, substrato cromogênico da β-glicuronidase. Também tem sido utilizado o MSA-MUG, que incorpora o substrato fluorogênico da enzima (4-metilumbeliferil-β-D-

glucuronídeo) [78, 80], bem mais barato do que o BCIG. Uma outra alternativa também bastante utilizada é o Petrifilm coliformes/*E. coli* da 3M Company, que contém um substrato cromogênico para a enzima β -glicuronidase, mas, ao contrário do MSA-BCIG, não tem como base o Ágar MacConkey Sorbitol. O meio seletivo utilizado no Petrifilm é o Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), que contém lactose, em lugar de sorbitol. Assim, utilizando-se o Petrifilm, a triagem inicial de *E. coli* O157:H7 deixa de ser feita pela fermentação do sorbitol, baseando-se exclusivamente na ausência de atividade da β -glicuronidase.

Confirmação sorológica

A confirmação do grupo sorológico O157 é feita pelo teste padrão de aglutinação em lâmina ou utilizando-se os “kits” de aglutinação em látex. No teste de aglutinação em látex mistura-se, sobre uma cartela de papelão branco, uma gota da suspensão do microrganismos com uma gota do antissoro O157 ligado a pérolas de látex coloridas. Na presença do antígeno a reação de aglutinação ocorre em poucos minutos e a visualização é mais fácil do que no teste em lâmina, devido ao desenvolvimento de cor no fundo branco. A desvantagem do teste em látex é que vários “kits” exigem a confirmação dos resultados positivos, repetindo-se o ensaio com o reagente controle, para eliminar casos de autoaglutinação [14]. Também é importante preparar a suspensão a partir de uma única colônia do microrganismo, porque inóculos pesados podem resultar em falsos resultados positivos [109]. Para a confirmação do grupo sorológico H7, o mais comum é a utilização de “kits” de aglutinação em látex, cujo princípio é o mesmo do O157, substituindo-se o antissoro. Entretanto, é importante lembrar que a expressão do antígeno H pode ser variável, uma vez que algumas cepas são imóveis no isolamento. Assim, é necessário que se faça a indução de motilidade antes do teste sorológico flagelar [40, 109]. Também é importante que se use inóculo pesado nesse ensaio (material de várias colônias), porque a quantidade presente em uma única colônia não é suficiente para aglutinar com o antissoro H7 presente no reagente de látex.

Confirmação bioquímica

Na confirmação bioquímica as características mais recomendadas para confirmar a suspeita de *E. coli* O157:H7 encontram-se descritas no Tabela 5. São consideradas particularmente úteis, além da atividade de β -glicuronidase e fermentação do sorbitol, negativas, o crescimento na presença de KCN (-), a fermentação da celobiose (-) e a produção de pigmento amarelo (-). A produção de pigmento amarelo é característica de *Escherichia hermannii*, que frequentemente provoca falsos positivos no plaqueamento diferencial em MSA e no teste sorológico somático com o antisoro O157 [48, 94].

A 3ª edição (1998) do MLG FSIS/USDA [26] recomenda uma etapa de confirmação preliminar em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Ágar Vermelho de Fenol Sorbitol Metil Umbeliferil- β -D-Glicuronídeo (PRS-MUG), verificando se a cultura apresenta características típicas de *E. coli* no EMB (colônias vermelhas com brilho verde metálico) e no PRS-MUG (sorbitol negativas, brancas e β -glicuronidase negativas, sem fluorescência sob luz UV) no PRS-MUG. As culturas típicas nesses dois meios são então submetidas à confirmação bioquímica completa, através das provas de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (fermentação da glicose positiva, fermentação da lactose e/ou sacarose positiva, produção de H₂S negativa, produção de gás positiva), crescimento em Ágar Lisina Ferro (LIA) (descarboxilação da lisina positiva, produção de H₂S negativa), fermentação do sorbitol e da celobiose em caldo (negativas), testes de indol (+), VM (+), VP (-), citrato (-), descarboxilação da lisina e ornitina em caldo (positivas), crescimento no Caldo Descarboxilase Base (positivo) e motilidade (positiva). O FDA recomenda a utilização de “kits” miniaturizados de identificação, apresentando uma lista de produtos comerciais como referência, resumida no Tabela 6.

Tabela 5. Características bioquímicas das cepas de *E. coli* O157:H7, em comparação com as cepas comuns de *E. coli* [48, 94].

Característica (48h incubação)	% de cepas positivas		Característica (48h incubação)	% de cepas positivas	
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> comum		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> comum
β-glicuronidase	0	96%	Glicose (ácido)	100%	100%
Sorbitol	0	80-95%	Glicose (gás)	98%	92%
KCN	0	<i>E.hermannii</i> (+)	Indol	100%	96-99%
Pigmento amarelo	(-)	<i>E.hermannii</i> (+)	Arabinose	100%	99%
Celobiose	0	0-1%	Trehalose	100%	98-99%
Esculina	0	31%	Manitol	100%	98-99%
Salicina	0	0	Lactose	100%	88-92%
Arginina	0	16%	Maltose	100%	91-98%
Adonitol	0	1-3%	Rhamnose	100%	84-91%
Inositol	0	1%	Xilose	100%	83-97%
Celobiose	0	0-1%	Lisina	100%	81-92%
Urease	0	0	Ornitina	100%	58-74%
Citrato	0	0	Rafinose	100%	20-49%
Sacarose	87%	42-54%	Dulcitol	100%	49-50%

Tabela 6. Kits miniaturizados de provas bioquímicas disponíveis para identificação de enterobactérias [51].

“Kit”	Fabricante	Microrganismos identificados
API 20E	BioMerieux	<i>Enterobacteriaceae</i>
BBL Crystal	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> e Gram negativos não fermentadores
Cobas IDA	Hoffmann LaRoche	<i>Enterobacteriaceae</i>
Cobas Micro-ID	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> e Gram negativos não fermentadores
Micro-ID	Remel	<i>Enterobacteriaceae</i>
Enterotube II	Roche	<i>Enterobacteriaceae</i>
Minitex	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i>
RapID	Innovative Diagnostics	<i>Enterobacteriaceae</i>
Spectrum 10	Austin Biological	<i>Enterobacteriaceae</i>
Vitek (automatizado)	BioMerieux	<i>Enterobacteriaceae</i>

Produção de verotoxinas

O Bacteriological Analytical Manual (BAM) da Food and Drug Administration [36] recomenda verificar a produção de verotoxinas através de ensaios de citotoxicidade em cultura de tecidos (células Vero), utilizando sondas genéticas específicas para os genes que codificam as verotoxinas I e II ou utilizando a técnica de PCR (polimerase chain reaction) com iniciadores (“primers”) também específicos para as verotoxinas I e II. Podem ainda ser utilizados “kits” de imunoensaios enzimáticos (ELISAs) como o Verotest da MicroCarb (USA) e o Premier EHEC da Meridian (USA), ou “kits” de ensaios sorológicos de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA), como VTEC-RPLA da Oxoid (Inglaterra) e o Verotox-F, da Denka Seiken (Japão) [71].

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS DE DETECÇÃO

Os métodos imunológicos exploram a reação de complexação antígeno/anticorpo e podem apresentar vários formatos, sendo mais comuns os imunoensaios enzimáticos do tipo ELISA, os ensaios de imunoprecipitação e os métodos baseados na separação imunomagnética (IMS) [34].

Imunoensaios enzimáticos

De acordo com SILVA [108], os imunoensaios enzimáticos (EIAs) aplicáveis à detecção de antígenos somáticos de bactérias em alimentos são do tipo heterogêneo, isto é, EIAs em que a atividade enzimática do marcador não sofre alteração quando da formação do complexo antígeno/anticorpo marcado. Nesse tipo de EIA, o excesso de anticorpo marcado que não foi complexado pelo antígeno deve ser removido, para não interferir na etapa de reação enzima/substrato imediatamente posterior. Essa remoção pode ser feita de diversas maneiras, sendo mais comum a imobilização de um dos imunorreagentes em um suporte sólido, que pode ser lavado após a etapa de complexação. Esse formato de EIA caracteriza o Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), cujos suportes sólidos podem ser filtros membranas, partículas metálicas removíveis magneticamente, partículas centrifugáveis de látex, sepharose, celulose ou hidróxido de titânio, pérolas de poliestireno ou poliacrilamida,

partículas de ouro coloidal ou, ainda, plástico rígido usado na confecção de agulhas e placas de microtitulação.

A sequência de etapas de complexação antígeno/anticorpo, bem como a seleção do imunoreagente que fica fixado à fase sólida caracterizam os ELISAs como [108]:

ELISAs indiretos - envolvem duas etapas de complexação antígeno/anticorpo. Na primeira, o antígeno, imobilizado na fase sólida, reage com anticorpos não marcados, induzidos em um determinado tipo de animal. Esses anticorpos passam então a atuar como antígeno na etapa seguinte, para um segundo tipo de anticorpos (induzidos contra os primeiros em um tipo diferente de animal) marcados com a enzima.

ELISAs diretos - envolvem uma única etapa de complexação, na qual o antígeno, fixado na fase sólida, reage diretamente com os anticorpos marcados.

ELISAs competitivos - envolvem a competição entre o antígeno presente na amostra e um antígeno padrão previamente fixado na fase sólida. Os anticorpos marcados são incubados na presença da amostra e do antígeno padrão e, após a complexação, todo o material complexado é removido, para a posterior adição do substrato da enzima.

ELISAs de captura ou sanduíche - apresentam duas etapas de complexação, ambas envolvendo o antígeno bacteriano. Na primeira etapa os anticorpos não marcados, fixados na fase sólida, reagem com o antígeno presente na amostra, promovendo a sua captura e imobilização. Na segunda etapa, o antígeno capturado reage com o mesmo tipo de anticorpos, porém, marcados com a enzima. Dessa forma, o antígeno permanece envolvido pelos anticorpos, na configuração chamada de sanduíche.

Na detecção de *E. coli* O157:H7, bem como de outros gêneros e espécies de bactérias comuns em alimentos, os ELISAs mais utilizados atualmente são os de captura, porque apresentam uma vantagem essencial em relação aos demais – o imunorreagente fixado à fase sólida é o anticorpo, tarefa que pode ser realizada previamente, sem a presença da amostra, sem as interferências dos componentes dos alimentos e de forma muito mais uniforme. Essa característica conferiu aos ensaios de captura maior facilidade para o desenvolvimento de “kits”, que foram essenciais à popularização da técnica. Atualmente,

há vários “kits” de ELISA disponíveis no mercado para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, apresentados no Tabela 7. A maioria detecta o antígeno somático de parede O157 de *E. coli*, exceto o EHEC TEK da Organon Teknika, que tem anticorpos para detectar os antígenos somáticos O157 e O26 e os antígenos flagelares H7 e H11. Os resultados são presuntivos, devendo ser confirmados através do isolamento das cepas e identificação bioquímica. Além disso, nenhum desses “kits” objetiva a quantificação da população de *E. coli* O157, são ensaios qualitativos e não têm sensibilidade para aplicação direta no alimento, exigindo uma etapa de pré enriquecimento para levar à população à níveis detectáveis [71].

Tabela 7. “Kits” de imunoenaios enzimáticos disponíveis no mercado para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos [71].

Nome comercial	Antígeno alvo	Formato do ensaio	Fabricante
PETRIFILM EHEC	O157	Blot-ELISA	3M, St. Paul, MN
EZ COLI	O157	Tube-ELISA	Difco, Detroit, MI
ASSURANCE	O157	ELISA	BioControl
TECRA	O157	ELISA	TECRA, Redmond, WA
<i>E. COLI</i> O157	O157	ELISA	LMD Lab., Carlsbad, CA
<i>E. COLI</i> O157	O157	ELISA	Meridian, Cincinnati, OH
PREMIER EHEC	O157:H7/NM	ELISA	Meridian, Cincinnati, OH
VIDAS	O157	Automated ELISA	BioMerieux, St.Louis, MO
EHEC-TEK	O157:H7 & O26:H11	ELISA	Organon Teknika, Durham, NC

Ensaio de imunoprecipitação

A técnica de imunoprecipitação popularizou-se com o desenvolvimento de “kits” para teste de gravidez e, atualmente, é amplamente utilizado na detecção de patógenos em alimentos. Também é um imunoensaio do tipo sanduíche, porém, em lugar de marcar os anticorpos com enzimas, a conjugação é feita com materiais precipitáveis, como partículas de latex coloridas ou ouro coloidal [34]. Uma alíquota do caldo enriquecido é depositada no

dispositivo, sobre uma matriz cromatográfica contendo os anticorpos conjugados com as partículas precipitáveis. Os anticorpos capturam os antígenos e fixam as células às partículas, que migram através da matriz até atingir uma região de reação, contendo um segundo tipo de anticorpos. Esses anticorpos aglutinam o antígeno capturado pelas partículas e a reação de aglutinação provoca a precipitação do material, formando uma banda colorida visível a olho nu. O ensaio é extremamente rápido (5 a 10 minutos) e simples, não exigindo qualquer lavagem ou manipulação. No entanto, assim como os ELISAs, não tem sensibilidade para a detecção direta a partir dos alimentos, exigindo uma etapa de pré enriquecimento para levar à população à níveis detectáveis. Os resultados são presuntivos e devem ser confirmados através do isolamento das cepas e identificação bioquímica. Há vários “kits” de imunoprecipitação disponíveis no mercado para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, apresentados no Tabela 8.

Tabela 8. “Kits” de imunoprecipitação disponíveis no mercado para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos [71].

Nome comercial	Antígeno alvo	Fabricante
REVEAL	O157	Neogen, Lansing, MI
VIP	O157	BioControl, Bellview, CA
NOW	O157	Binax, Portland, ME
IMMUNOCARD	O157	Meridian, Cincinnati, OH
QUIX	O157	Universal Health Watch, Columbia, MD

Separação imunomagnética (IMS)

Na separação imunomagnética são utilizadas microesferas magnéticas recobertas com os anticorpos, adicionadas ao caldo de enriquecimento. O microrganismo alvo é capturado pelos anticorpos presentes nas esferas que, em seguida, são removidas magneticamente. Para a remoção um ímã é posicionado na parede do frasco, separando as células do meio de cultura, que é descartado. As esferas são lavadas e a suspensão purificada pode ser então utilizada no plaqueamento seletivo diferencial ou em outros ensaios [34].

Em setembro de 1999 o FSIS adotou essa metodologia para detecção de *E. coli* O157:H7 em produtos cárneos, utilizando as microesferas da Dynal Biotech, Lake Success, NY (Dynabeads 710.04 *E. coli* O157).

Seqüência da análise [26]: pré enriquecimento em caldo mECn 35°/20-24h ⇒ verificação inicial da presença com um “kit” de ELISA O157:H7/NM ⇒ ELISA positivo – filtrar 1ml do caldo, adicionar as dynabeads e manter sob agitação 10-15min para captura ⇒ separação imunomagnética ⇒ lavagem das microesferas e ressuspensão em tampão ⇒ plaqueamento da suspensão e diluições em Rainbow Agar O157 (Biolog Inc., Hayward, California) ⇒ colônias típicas (pretas ou cinza) – teste de agutinação em latex com antissoro O157 ⇒ aglutinação positiva – purificar as colônias em Ágar Sangue ⇒ confirmação bioquímica utilizando um “kit” de identificação ⇒ culturas confirmadas – teste de aglutinação em látex com antissoro O157:H7 ⇒ aglutinação positiva – testar produção de verotoxinas com um “kit” comercial.

MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS NOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Os métodos moleculares mais amplamente utilizados na detecção de patógenos em alimentos são as sondas genéticas e a reação de polimerase em cadeia (PCR), popularizados através do desenvolvimento de “kits” comerciais [71].

Sondas genéticas

De acordo com HILL *et al.* [50], a detecção por sondas genéticas é fundamentada na presença ou ausência de genes específicos do microrganismos alvo e a base física dos testes é a própria estrutura de dupla fita do DNA. A estabilidade da conformação em fita dupla é conferida pelas pontes de hidrogênio estabelecidas entre a adenina (A) de uma fita e timina (T) da outra, ou entre a guanina (G) de uma e a citosina (C) de outra. As pontes de hidrogênio podem ser quebradas elevando-se o pH (acima de 12) ou a temperatura (acima de 95°C), o que desnatura o DNA e resulta em fitas simples. Quando o pH ou a temperatura retornam ao normal, as pontes de hidrogênio são restabelecidas e a molécula volta à

conformação de fita dupla. A fonte das fitas simples que se alinham na formação da dupla hélice é irrelevante, se houver complementaridade entre elas. Se cada fita for originária de fontes diferentes, a molécula resultante é chamada híbrida e o processo é chamado hibridização de DNA. Quanto maior for a homologia entre a sequência de bases de cada fita simples complementar, maior será a estabilidade da molécula híbrida.

Uma sonda genética é um fragmento de DNA marcado, que contém a sequência total ou parcial de um gene específico com função conhecida. Colocadas em contato com o DNA dos microrganismos presentes em uma amostra, podem hibridizar com uma sequência homóloga complementar, sinalizando a presença do microrganismo alvo. Na detecção de *E. coli* O157:H7 dois tipos de sondas têm sido utilizadas, as que detectam os genes das toxinas shiga e as que detectam o gene da β -glicuronidase.

Para os genes das toxinas shiga o BAM/FDA [50] destaca 2 oligodeoxirribonucleotídeos sintéticos, preparados a partir dos dados da sequência da subunidade A da Stx1 e Stx2, incluindo os nucleotídeos 473-490 e 472-490, respectivamente. O método de enriquecimento recomendado é o de DOYLE & SCHOENI [30] e o meio para plaqueamento diferencial é o HC (Hemorrhagic Colitis) Agar descrito no BAM [36], incubado a 37 ou 43°C.

No caso do gene da β -glicuronidase (*uidA*), é interessante notar que, embora *E. coli* O157:H7 não expresse essa característica, o gene também se encontra presente nas cepas desse sorotipo [38]. A análise da sequência do *uidA* nessas cepas mostrou várias mutações, uma delas servindo de base para o desenvolvimento da sonda PF-27, recomendada pelo BAM/FDA [50]. A PF-27 é considerada específica para *E. coli* O157:H7, não hibridizando com outras cepas EHEC, outras cepas de *E. coli* ou outras enterobactérias [39].

Reação de polimerase em cadeia (PCR)

De acordo com O'SULLIVAN [83], a técnica de PCR, na sua forma mais simples, é utilizada para amplificar regiões (seqüências) específicas de DNA em bilhões de vezes, usando uma polimerase termoestável (usualmente *Taq*, a DNA polimerase de *Thermus aquaticus*), deoxinucleotídeos (dNTP) e dois iniciadores, cujas seqüências são

complementares entre si e à sequência alvo (“template”). A amplificação é obtida aplicando-se múltiplos ciclos de PCR, geralmente 30 a 40 e, durante cada ciclo, ocorre a seguinte sequência de reação: aquecimento a aproximadamente 94°C, para desnaturar a fita dupla do DNA, resfriamento a menos de 55°C (condição típica), para que os iniciadores hibridizem com as sequências que lhes são complementares nas fitas simples obtidas, reaquecimento a 72°C, para que a polimerase sintetize a cópia do DNA na região entre os dois iniciadores. Como cada fragmento gerado torna-se o alvo do próximo ciclo de PCR, a amplificação é exponencial e uma simples cópia pode ser potencialmente amplificada a 2^n , onde “n” é o número de ciclos de PCR. Assim, num PCR típico de 35 ciclos, podem ser geradas aproximadamente $3,4 \times 10^{10}$ cópias da sequência alvo. Também é possível utilizar mais de um conjunto de iniciadores, diferentes entre si, para permitir a amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo, na técnica de Multiplex PCR. Após a amplificação os fragmentos obtidos são separados por eletroforese em gel de agarose, gerando um perfil de fragmentos característico das cepas testadas [83].

A especificidade do método na detecção de um microrganismo alvo é baseada na utilização de iniciadores que amplifiquem especificamente sequências características desse microrganismo. Se houver conhecimento de uma ou mais sequências que sejam exclusivas do DNA do alvo, o resultado do ensaio será definitivo, não exigindo confirmação. Se as sequências não forem exclusivas, devem ser pouco comuns em outras cepas do mesmo ambiente e o resultado do ensaio será presuntivo. A combinação de várias sequências alvo no multiplex PCR aumenta muito a especificidade do ensaio, diminuindo a taxa de falsos positivos. No caso da *E. coli* O157:H7 as sequências de vários genes têm sido utilizadas em ensaios de PCR, isoladas ou em combinação, incluindo [75, 117]:

- Genes das toxinas shiga (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*)
- Gene da enterohemolisina presente no plasmídio pO157 (*hlyA*),
- Gene da intimina (*eaeA*)
- Gene que codifica o antígeno somático do sorotipo O157 (*rfbE*),
- Gene que codifica o antígeno flagelar do sorotipo H7 (*fliC*)
- Gene da β-glicuronidase (*uidA*)

Para a análise de alimentos encontram-se disponíveis no mercado, atualmente, dois “kits” comerciais que fornecem os reagentes na forma pronta para uso, o BAXTM da Dupont/Qualicon e o TaqMan da Applied Biosystems.

O BAX utiliza um jogo de iniciadores específicos para *E. coli* O157:H7, selecionadas a partir da análise do genoma de 113 cepas O157:H7 e 176 não-O157:H7. Esse conjunto iniciador amplifica uma sequência de DNA de 530 bp em 99% das cepas O157:H7 e em zero das não-O157. O método tem sensibilidade para detectar 10⁵ UFC/ml de *E. coli* O157:H7 na amostra enriquecida, na presença de uma microbiota acompanhante de até 10⁹ UFC/ml [4]. Foi validado pela AOAC em 1999 [3], para a análise de carne moída crua, com limite de detecção de 1,8 UFC/25g. O sistema é todo automatizado e os reagentes acompanham o “kit” na forma de tabletes, não exigindo qualquer preparação. É requerida uma etapa de enriquecimento, nas condições normalmente utilizadas pelo laboratório, seguida de uma etapa de lise e aplicação do PCR. A grande vantagem do BAX é que os resultados, obtidos em 24 horas, são definitivos e não exigem qualquer etapa subsequente de confirmação.

O TaqMan utiliza um par de iniciadores que amplifica uma sequência de DNA de 633 bp, incluindo o gene *eaeA* e uma região adjacente. O ensaio é presuntivo e, nos testes realizados por MENG *et al.* [70], detectou 67 cepas de *E. coli* O157:H7, 2 cepas de *E. coli* O157:NM e 7 de 11 *E. coli* O55:H7 e O55:NM testadas. Não foram detectadas 34 cepas de outros 29 sorotipos de *E. coli* nem 25 cepas de outras 8 espécies de bactérias testadas. A quantidade mínima do DNA alvo detectada foi 5pg e o número mínimo de células foi de 25 a 38 UFC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, E. R.; BOASE, J.; DAVIS, M. *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 44, n. 9, p. 157-160, 1995.
2. AMARAL T. A. T. G. **Pesquisas de interesse**. Disponível em <http://www.unifesp.br/dmip/tania.htm>. Acesso em: 13 mar. 2003.
3. AOAC RI. **Performance Tested Methods Report - Qualicon™ BAX for Screening *E. coli* O157:H7 July 28, 1999**. Disponível em: <http://www.aoac.org/RI/DATABASE/990701.PDF>. Acesso em: 02 mar. 2003.
4. BARBOUR, W. M.; ECRET, L. D.; JENSEN, M. A. *et al.* A PCR-based method for the detection of *E. coli* O157:H7 from ground beef. In: THE 96th GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 1996. **Anais**. Washington: American Society for Microbiology, 1996. p.396.
5. BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; JERSE, A. E.; WACHSMUTH, I.K. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 165, p. 979-980, 1992.
6. BASSLER, H. A.; FLOOD, S. J.; LIVAK, K. J. *et al.* Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3724-3728, 1995.
7. BAUER, M. E.; WELCH, R. A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 167-175, 1996.
8. BELL, B. P.; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P. M. *et.al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 17, p. 1349-1353, 1994.

9. BEUTIN, L.; ALEKSIC, S.; ZIMMERMANN, S.; GEIER, K. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 183, p. 13-21, 1994.
10. BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H. *et al.* Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 2483-2488, 1993.
11. BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 631-635, 1995.
12. BEUTIN, L.; ZIMMERMAN, S.; GEIER, K. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, p. 635-639, 1998.
13. BILGE, S. S.; VARY JR., J. C.; DOWELL, S. F.; TARR, P. I. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, p. 4795-4801, 1996.
14. BORCZYK, A. A.; HARNETT, N.; LOMBOS, M.; LIOR, H. False positive identification of *Escherichia coli* O157 by commercial latex agglutination tests. **Lancet**, London, v. 336, p. 946-947, 1990.
15. BURKS, G.; LOGAN, B. E. Direct measurement of bacterial adhesion to solid surfaces using bacteria with varying outer layer surface composition. In: LOGAN, B. E.; HATCHER, P. G.; GRAY, K. (Ed.). **Analysis of environmental phenomena at molecular scales**. Preprints of Extended Abstracts. Chicago: American Chemical Society, 2001. v. 41, n. 2, p. 271-275.

16. CALDERWOOD, S. B.; ACHESON, D. W. K.; KEUSCH, G. T. *et al.* Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 62, p. 118-119, 1996.
17. CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A. *et al.* Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 266-270, 2000.
18. CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 42, p. 258-263, 1993.
19. CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle at Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 111-121, 1999.
20. CERQUEIRA, A.M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. 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**, Georgia, v. 60, p. 1-5, 1997.
21. CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; SIDDONS, C. A. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 40, p. 424-427, 1994.
22. COMO-SABETTI, K.; REAGAN, S.; ALLAIRE, S. *et al.* Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts - Michigan and Virginia, June-July 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 46, p. 741-744, 1997.

23. COOKSON, A. L.; HAYES, C. M.; PEARSON, G. R. *et al.* Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H⁻ with a novel combination of virulence factors. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 51, p. 1041-1049, 2002.
24. COSSART, P.; LECUIT, M. Microbial pathogens: an overview. **In:** COSSART, P.; BOQUET, P.; NORMARK, S.; RAPPUOLI, R. **Cellular Microbiology**. Washington: ASM Press, 2000. Cap. 1, p.1-28.
25. DESMARCHELIER, P. M.; GRAU, F. H. *Escherichia coli*. **In:** HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JN SON, I. *et al.* (Ed.). **Foodborne microorganisms of public health significance**. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.
26. DEY, B. P.; LAT TUADA, C. P. (Ed.). **Microbiology laboratory guidebook, 3rd Ed.** Washington: United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science Microbiology Division, 1998. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/ophs/microlab/mlgbook.htm>>. Acesso em 20 mar. 2003.
27. DONOHUE-ROLFE, A.; ACHESON, D. W. K.; KANE, A. V.; KEUSCH, G. T. Purification of Shiga toxin and Shiga-like toxins I and II by receptor analog affinity chromatography with immobilized P1 glycoprotein and the production of cross-reactive monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, p. 3888-3893, 1989.
28. DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 289-302, 1991.
29. DOYLE, M. P.; PADHYE, V. V. *Escherichia coli*. **In:** DOYLE, M. P. (ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1989. p. 235-281.
30. DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2394-2396, 1987.
31. EDUARDO, M. B.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; CAMPOS, J. C.; KITAGAWA, B. Y. **Síndrome Hemolítico-Hurêmica – Normas e Instruções**. São

- Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso em 26/03/03.
32. ELSTROM, R. Anemia hemolítica. **Enciclopedia Médica en Español**, review provided by VeriMed Healthcare Network, 2001. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000571.htm>>. Acesso em 26 mar. 2003.
33. ELSTROM, R. Trombocitopenia. **Enciclopedia Médica en español**, review provided by VeriMed Healthcare Network, 2001. Disponível em <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000586.htm>>. Acesso em 26 mar. 2003.
34. ENTIS, P.; FUNG, Y. C.; GRIFFITHS, M. W. *et al.* Rapid methods for detection, identification, and enumeration. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2001. Cap. 10, p. 89-126.
35. FAITH, N. G.; SHERE, J. A.; BROSCHE, R. *et al.* Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1519-1525, 1996.
36. FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Bacteriological analytical manual**. 8th ed. Revision A. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998. Paginação irregular.
37. FDA/CFSAN. *Escherichia coli* O157:H7. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook (The “Bad Bug Book”)**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2001. Cap. 15. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/badbug.zip>>. Acesso em 20/03/01.
38. FENG, P.; LUM, R.; CHANG, G. Identification of *uidA* gene sequences in beta-D-glucuronidase (-) *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 320-323, 1991.

39. FENG, P. Identification of invasive *Yersinia* spp. using oligonucleotide probes. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 6, p. 291-297, 1992.
40. FIELDS, P. I.; BLOM, K.; HUGHES, H. J. *et al.* Molecular characterization of the gene encoding H antigens in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 1066-1070, 1997.
41. FSIS, 2003. Microbiological results of raw ground beef products analyzed for *Escherichia coli* O157:H7. United States Department of Agriculture, **Food Safety and Inspection Service Eletronic Reading Room**. Disponível em:
<<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/ecoltest/tables1.htm>>. Acesso em: 19 fev. 2003.
42. GARBER, L. P.; WELLS, S. J.; HANCOCK, D. D. *et al.* Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 207, p. 46-49, 1995.
43. GARZA-VELASCO, R.; LAGOS-ESCAMILLA, L.; MEJÍA-CHÁVEZ, A. G. La importancia clínica de los padecimientos ocasionados por ECEH O157:H7 y su diagnóstico de laboratorio. **Lab-Acta**, v. 13, p. 51-60, 2001. Disponível em:
<<http://www.imbiomed.com.mx/Labacta/Lav13n2/espanol/Wla0012-04.html>>. Acesso em 02 abr. 2003.
44. GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN, J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. (Ed.). **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995. p. 739-761.
45. GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 13, p. 60-98, 1991.
46. GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F. *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz On Line**, v. 97, n.

- 8, p. 1085-1089, 2002. Disponível em <<http://memorias.ioc.fiocruz.br/4607.html>>. Acesso em 01 abr.2003.
47. GUTH, B. E. C.; LOPES, R.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. First shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 535-536, 2002.
48. HALDANE, D. J. M.; DAMM, M. A. S.; ANDERSON, J. M. 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.
49. HEALTH SCIENTIFIC COMMITTEES. **Verocytotoxin-Producing *Escherichia Coli* (VTEC)**. Report of the Scientific Veterinary Committee, 17 September 1997. Scientific Veterinary Committee Working Group of Health Scientific Committees - Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 1997. Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/oldcomm4/out15_en.html>. Acesso em: 02 abr. 2003.
50. HILL, W. E.; DATTA, A. R.; FENG, P.; LAMPEL, K. A.; PAYNE, W. L. Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes. In: FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Bacteriological analytical manual**. 8th ed. Revision A. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998. Cap. 24. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html>>. Acesso em: 07 abr. 2003.
51. HITCHINS, A. D.; FENG, P.; WATKINS, W. D. *et al.* *Escherichia coli* and coliform bacteria. In: FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Bacteriological analytical manual**. 8th ed. Revision A. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998. Cap. 4. p.4.01-4.29.
52. HUPPERTZ, H. I.; BUSCH D.; SCHMIDT, H.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 128, p. 341-346, 1996.

53. IRINO K, GOMES TAT, VAZ TMI *et al.*, 2000. Prevalence of Shiga toxin and intimin gene sequences among *Escherichia coli* of serogroups O26, O55, O111, O119 and O157 isolated in São Paulo, Brazil. THE 4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* INFECTIONS, 2000, Kyoto, Japan. **Anais.** p. 107.
54. IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M. A. M. F. *et al.* O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 446-447, 2002.
55. JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D. *et al.* Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 44, p. 109-114, 1987.
56. JOYS, T. M. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with other flagellins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 260, p. 15758-15761, 1985.
57. KNIGHT, P. Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 59, n. 5, p. 247-250, 1993.
58. KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1.
59. LAW, D.; KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 700-702, 1995.
60. LEHRER, M. Purpura. **Enciclopedia Médica en español**, review provided by VeriMed Healthcare Network, 2001. Disponível em:
<<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003232.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2003.
61. LEVINE, M. M.; XU, J.; KAPER, J. B. *et al.* A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause

- hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 175-182, 1987.
62. LIOR, H. *Escherichia coli* O157:H7 and verocitoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 14, n. 7, p. 378-382, 1994.
63. LOUIE, M.; AZAVEDO, J.; CLARKE, R.; BORCZYK, A.; LIOR, H.; RICHTER, M.; BRUNTON, J. Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 112, p. 449-461, 1994.
64. MABECK, C. E.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. *Escherichia coli* serotypes and renal involvement in urinary-tract infections. **Lancet**, London, v. 1, n. 7713, p. 1312-1314, 1971.
65. MACNAB, R. M. Flagella and motility. In: NEIDHARDT, F. D. (Ed.). ***Escherichia and Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology**, 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1996. v. 1, p. 123-145.
66. MAKINO, K.; ISHII, K.; YASUNAGA, T. *et al.*, 2001. **Complete Nucleotide Sequences of 93-kb and 3.3-kb Plasmids of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Derived from Sakai Outbreak**. Disponível em: <<http://www.dna-res.kazusa.or.jp/5/1/01/HTMLA/>>. Acesso em: 03 abr. 2003.
67. MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol MacConkey Medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 869-872, 1986.
68. MAURER, J. J.; SCHMIDT, D.; PETROSKO, P. *et al.* Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2954-2960, 1999.

69. MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T. *et al.* Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 51, p. 179-184, 1994.
70. MENG, J., ZHAO, S., DOYLE *et al.* Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157: H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 32, n. 1-2, p. 103-113, 1996.
71. MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 35, p.331-341.
72. MILIWEBSKY, E. S.; CHINEN, I.; CHILLEMI, G. *et al.* Síndrome urémico hemolítico en niños de argentina: Asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina shiga. **NefroRed**, 2000. Disponível em <http://nefrored.net/insufcronic9.htm>. Acesso em 01 abr. 2003.
73. MILLS, M.; PAYNE, S. M. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 3004-3009, 1995.
74. MOSS, J. E.; IDANPAAN-HEIKKILA, I.; ZYCHLINSKY, A. Induction of apoptosis by microbial pathogens. In: COSSART, P.; BOQUET, P.; NORMARK, S.; RAPPUOLI, R. **Cellular Microbiology**. ASM Press, 2000. p.275-290.
75. NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 142-201, 1998.
76. NATARO, J. P.; LEVINE, M. M. *Escherichia coli* diseases in humans. In: GYLES, C. L. (Ed.). **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 285-333.
77. O'BRIEN, A. D.; TESH, V. L.; DONOHUE-ROLFE, A. *et al.* Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 180, p. 65-94, 1992.

78. OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E. R.; LATTUADA, C. P. Use of 3-bromo-4-chloro-5-indoxyl- β -D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O 157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 53, p. 941-943, 1990.
79. OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E. R.; 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**, Georgia, v. 53, p. 936-940, 1990.
80. OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E. R.; BENNET, B. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 53, p. 249-252, 1990.
81. OLSEN, S. J.; MacKINON, L. C.; GOULDING, J. S. *et al.* Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.49, n.SS01, p.1-51, March, 2000.
82. ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: BERGAN, T. (Ed.). **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1984. v. 14, p. 43-112.
83. O'SULLIVAN, D. J. Methods for the analysis of intestinal microflora. In: TANNOCK, G. W. (Ed.). **Probiotics: a Critical Review**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999. Cap. 3.
84. PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2693-2698, 1991.
85. PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, Georgia, v.55, n. 7, p. 555-556, 1992.

86. PARISH, C. R.; WISTAR, R.; ADA, G. L. Cleavage of bacterial flagellin with cyanogen bromide: antigenic properties of the protein fragments. **Biochemical Journal**, London, v. 113, p. 501-506, 1969.
87. PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 450-479, 1998.
88. PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA and saa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 271-274, 2002.
89. PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 6999-7009, 2001.
90. PICHETH, C. M. T. F. **Identificação e Caracterização Molecular de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC)**. Projeto PIBIC/UFPR/CNPq, 2002. Disponível em <<http://www.prppg.ufpr.br/pibic/setores/saude/45733155949-projeto-272.doc>>. Acesso em 27 mar.2003.
91. PICKERING, L. K.; OBRIG, T. G.; STAPLETON, F. B. Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 13, p. 459-476, 1994.
92. PIÉRARD, D.; STEVENS, D.; MORIAU, L.; LIOR, H.; LAUWERS, S. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 3, p. 531-539, 1997.
93. RATINER, Y. A. New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 979-984, 1998.
94. RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R. *et al.* Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, p. 2006-2012, 1988.

95. RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; BALBI, L. *et al.* Intestinal bleeding and occlusion associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127: H21. **Medicina**, Buenos Aires, v. 60, p. 249-252, 2000.
96. ROCHA, H. H. A. G. **Diagnóstico diferencial das principais causas de sangramento em uma unidade de emergência - visão clínica e laboratorial**. Disponível em: <http://www.lamina.com.br/p_informe-8.htm>. Acesso em: 26 mar. 2003.
97. RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Publica**, Mexico, v. 44, p. 464-475, 2002. Disponível em: <<http://www.insp.mx/salud/index.html>>. Acesso em: 25 mar. 2003.
98. SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. 448 p.
99. SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; HANCOCK, D. D. *et al.* Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 2616-2619, 1995.
100. SANDHU, K. S.; CLARKE, R. C.; McFADDEN, K. *et al.* Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 116, p. 1-7, 1996.
101. SAVARINO, S. J.; McVEIGH, A.; WATSON, J. *et al.* Enterogregative *Escherichia coli* heat stable enterotoxin is not restricted to enterogregative *E. coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, p. 1019-1022, 1996.
102. SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, p. 1055-1061, 1995.
103. SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2364-2367, 1996.

104. SCHMIDT, H.; KERNBACH, C.; KARCH, H. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology**, United Kingdom, v. 142, p. 907-914, 1996.
105. SCHMITT, C. K.; MEYSICK, K. C.; O'BRIEN, A. D. Bacterial toxins: friends or foes? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 224-234, 1999.
106. SCHNAITMAN, C. A.; KLENA, J. D. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, p. 665-682, 1993.
107. SHUTERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J.; BRAXTON, D. S. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, p. 29-49, 1995.
108. SILVA, N. Imunoensaios enzimáticos aplicados à detecção de *Salmonella* em alimentos. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 173-185, 1991.
109. SOWERS, E. G.; WELLS, J. G.; STOCKBINE, N. A. Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H antigens of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 1286-1289, 1996.
110. TAKEDA, Y. Shiga and Shiga-like (Vero) toxins. In MOSS, J.; IGLEWSKI, B.; VAUGHAN, M.; TU, A. T. (Ed.). **Bacterial toxins and virulence factors in disease**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 313-326.
111. TARR, P. I. *Escherichia coli* O157:H7: Overview of clinical and epidemiological issues. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 57, p. 632-636, 1994.
112. TARR, P. I.; NEILL, M. A. Perspective: The problem of non-O157:H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 174, p. 1136-1139, 1996.
113. TORRES, A. G.; PAYNE, S. M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 23, p. 825-833, 1997.

114. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Escherichia coli* **O157:H7**: issues and ramifications. Colorado: Center for Epidemiology and Animal Health, 1994. 48p.
115. VASCONCELOS, A. C. **Patologia Geral em Hipertexto**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2000. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/~pat/Apoptose.htm>>. Acesso em: 31 mar. 2003.
116. WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 135, p. 17-22, 1996.
117. WANG, G.; CLARK, C. G.; RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3613-3619, 2002.
118. 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**, Georgia, v.58, n. 1, p. 7-12, 1995.
119. WEI, L.; JOYS, T. M. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 186, p. 791-803, 1985.
120. W.H.O. 1997. **Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections**. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/97.6. Disponível em: <<http://www.who.int/fsf/ehc.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2003.
121. W.H.O. 1998. **WHO/FSF/FOS/97.6**. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/docs/whocsrph988.html/3surveillanceandfrequency.html>>. Acesso em: 25 abr. 2003.
122. W.H.O., 1998. **WHO/CSR/APH/98.8**. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting.

Berlin, Germany, 23-26 June 1998. Disponível em <<http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/whocsraph988c.html>>. Acesso em 03 mar. 2003.

123. WILLSHAW, G. A.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 166, p. 797-802, 1992.
124. ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 39, p. 155-158, 1993.

Capítulo 2

Ocorrência de
E. coli O157:H7
em hambúrguer
produzido no Brasil

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli O157:H7 pertence ao grupo das *E.coli* entero-hemorrágicas (EHEC) produtoras de verotoxina (VT), também conhecida como toxina shiga (ST), similar à produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I [9]. A VT provoca uma doença chamada de colite hemorrágica que, em casos mais graves, resulta em um quadro conhecido como síndrome urêmica hemolítica (HUS) [6]. De acordo com WILLSHAW *et al.*[10], as cepas EHEC podem pertencer a diferentes grupos sorológicos somáticos, mas a maioria das linhagens associadas à HUS são do sorotipo O157:H7. Essas cepas diferem das demais cepas de *E.coli* em algumas características, sendo mais importantes a não fermentação do sorbitol e a não-produção da enzima β -glicuronidase [8]. A colite hemorrágica caracteriza-se como uma diarreia sanguinolenta acompanhada de dores abdominais severas, que pode agravar-se para o quadro de síndrome urêmica hemolítica (HUS) em cerca de 10% dos casos, principalmente idosos e crianças [9]. O trato intestinal de bovinos e ovinos parece ser o principal reservatório das cepas *E.coli* O157:H7, com incidência nas fezes variando de 0 a 10% e maior frequência observada em animais jovens [1]. Em suínos e aves, a presença parece não ser comum [1]. Já foram incriminados em surtos, dentre outros alimentos, a carne bovina mal-cozida e outros produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres e salsichas tipo “hot-dog”), o leite cru, os vegetais, os molhos para saladas, a maionese e o suco maçã. A carne bovina moída, de maneira especial, tem sido o principal agente de surtos registrados nos Estados Unidos e outros países da Europa, com ocorrência variando de 0 a 3,7% nesse tipo de produto [1].

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de hambúrguer foram coletadas em oito frigoríficos localizados nas regiões sul e sudeste do Brasil, responsáveis pelo suprimento da maior parte do produto exportado e comercializado no mercado interno. A amostragem foi feita semanalmente, no período de janeiro a setembro de 1997 e parte das amostras foi analisada utilizando-se o imunoensaio

enzimático da 3M Company (HEC TEST KIT 6477) e parte utilizando-se metodologia cultural tradicional descrita por JOHNSONS, ROSE *et al.*[2]. Descrição dos métodos:

Método cultural

25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo EC Modificado Novobiocina (mECn), incubadas por 6 horas em shaker com temperatura controlada a 37°C e, em seguida, incubadas em incubadora estática por mais 18 horas a 37°C. Foram preparadas diluições em série do caldo mECn enriquecido e 1,0ml das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram inoculados em Petrifilm coliformes *E.coli* (3M Company). Os petrifilms foram incubados a 42°C/18-24h e 8 colônias típicas de cada amostra foram selecionadas para confirmação. As colônias foram transferidas para placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB Levine - DIFCO) e Ágar Vermelho de Fenol Base (DIFCO) suplementado com 0,5% de Sorbitol e 0,005% de 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (PRS-MUG), distribuídas em 8 setores demarcados em cada placa. As placas foram incubadas a 35°C/18-24h e as culturas com características típicas no par de placas (colônias sorbitol negativas, sem fluorescência em PRS-MUG e colônias púrpura com ou sem brilho metálico em EMB) foram submetidas à confirmação. Na confirmação as culturas foram submetidas ao teste de sorologia com o antisoro O157, utilizando-se o método de aglutinação em látex (Oxoid Latex Test) e, em caso positivo, purificadas e identificadas através do kit de identificação da Becton Dickson (BBL CRYSTAL Enteric/Non Fermenter Identification Kit). As culturas identificadas como *E.coli* foram consideradas suspeitas e submetidas ao teste de produção de verotoxinas, utilizando-se o método de aglutinação passiva reversa em látex (OXOID RPLA TEST KIT).

Método de imuno-ensaio enzimático (ELISA)

25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo EC Modificado Novobiocina (mECn) e incubadas por 6 horas em shaker com temperatura controlada a 37°C. As diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram inoculados em Petrifilm coliformes *E.coli* (3M Company), incubados a 42°C/18-24h e, no caso de presença de colônias típicas, submetidos ao

imunoensaio enzimático, seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante. Todas as colônias sinalizadas pelo imunoensaio foram submetidas à confirmação, seguindo o mesmo procedimento utilizado no método cultural, incluindo-se o teste de aglutinação em látex.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência de *E.coli* O157 em hambúrgueres

Na Tabela 1 pode-se observar que, na avaliação preliminar, foi observada a ocorrência de cepas suspeitas de *E.coli* do sorotipo O157 em 1,9% das amostras analisadas, tendo sido isoladas 21 cepas para confirmação. Na etapa posterior, entretanto, nenhuma dessas cepas foi confirmada, em função de várias características atípicas: **a)** todas apresentaram fermentação positiva do sorbitol no Kit de identificação, embora tenham sido previamente selecionadas como sorbitol negativas nas placas de ágar PRS-MUG. Esse resultado parece demonstrar que as placas de PRS-MUG não são uma alternativa adequada para a triagem inicial das cepas sorbitol negativas, sendo mais recomendável, segundo os trabalhos publicados até o momento, o Ágar MacConkey Sorbitol; **b)** nos testes subsequentes de confirmação sorológica, que incluíram a aglutinação com outros antisoros O157 produzidos no Brasil (antisoro O157 da Probac e do Instituto Adolfo Lutz) e a repetição dos testes de ELISA e Látex, nenhuma aglutinou com os demais antisoros e oito não aglutinaram na repetição do teste com o antisoro original; **c)** apenas uma apresentou produção de verotoxinas (ST1 e ST2), porém quando o teste foi repetido posteriormente o resultado foi negativo. É provável, em se tratando de uma característica intermediada por fagos temperados, que os genes tenham sido perdidos nos repiques da cultura. Segundo KARCH *et al* [4], a perda desses genes é relativamente freqüente nas cepas de *E.coli* O157:H7, tendo sido observada por esses autores em 8 (4,5%) de 174 cepas produtoras da ST1 (VT1) e em 10 (6,7%) de 149 cepas produtoras da ST2 (VT2).

Tabela 1. Ocorrência de cepas de *E.coli* do sorotipo O157 em hambúrguer produzido no sul e sudeste do Brasil, no período de janeiro a setembro de 1997.

Empresa	Amostras analisadas	Amostras negativas ¹	Amostras suspeitas ²	Amostras confirmadas ³
A	90	87	3 (3,3%)	0
B	189	189	0	0
C	117	114	3 (2,6%)	0
D	110	107	3 (2,7%)	0
E	88	85	3 (3,4%)	0
F	145	142	3 (2,1%)	0
G	99	98	1 (1,0%)	0
H	48	47	1 (2,1%)	0
Total	886	869	17 (1,9%)	0

¹ Amostras nas quais não foi detectada a presença de *E.coli* do sorotipo O157.

² Amostras nas quais foi detectada a presença de cepas do sorotipo O157 identificadas como *E.coli*.

³ Amostras nas quais a cepas suspeitas apresentaram todas as características típicas de *E.coli* O157:H7 (fermentação negativa do sorbitol, ausência da enzima β -glicuronidase, produção de verotoxinas)

Comparação entre o método cultural e o imunoensio enzimático da 3M

Numa comparação entre os resultados obtidos a partir das amostras analisadas pelo método cultural e os obtidos das amostras analisadas pelo método do imunoensaio da 3M, observamos que 50% das amostras analisadas pelo método cultural apresentaram resultado presuntivo positivo em Petrifilm, com uma média de 7 colônias/amostra tendo que ser submetidas à confirmação. No método de imunoensaio esses número foram reduzidos a apenas 8% das amostras analisadas, com 4 colônias presuntivas/amostra. Assim, o KIT de imunoensaio da 3M apresentou um número muito menor de amostras com falsos resultados presuntivos, eliminando grande parte das amostras negativas nas etapas iniciais da análise. Isso representou uma vantagem significativa em relação ao método cultural, em termos de

redução do tempo e do trabalho despendido na identificação de cepas com reação de aglutinação positiva com o soro O157.

Por outro lado, cabe salientar que ambos os métodos apresentaram uma alta taxa de falsos presuntivos (aglutinação positiva com o antisoro O157) devidos a cepas de enterobactérias, que no método cultural representaram 78% das cepas isoladas e no método de imunoensaio 83%. As enterobactérias mais frequentemente isoladas foram *Enterobacter* sp (33% particularmente *E.cloacae*), *Klebsiella* sp (22,5% particularmente *K.pneumoniae* e *K.oxytoca*), *Citrobacter* sp (10% particularmente *C.freundii*), *Serratia* sp (6,3% particularmente *S.rubidaea*), *Hafnia alvei* (5%), *Pantoea agglomerans* (3,7%), *Kluyvera ascorbata* (2,5%), *E.hermannii* e *E.fergusonii* (2,5%) e enterobactérias não identificadas (6,3%). Esses valores, embora bem maiores do que os esperados, quando comparados com a ocorrência na análise de *Salmonella*, por exemplo, não foram considerados surpreendentes, considerando-se os seguintes fatos:

Método de imunoensaio - Kit HEC da 3M. Nossos resultados não diferiram significativamente dos obtidos por outros pesquisadores, conforme relatos de MARTIN *et al.* [5], que isolaram 21 cepas a partir de sinais obtidos nos discos reativos, nenhuma confirmada, e OKREND *et al.* [7], que isolaram 17 cepas, 12 (70,5%) não confirmadas. Quando comparamos o ELISA da 3M com outros imunoensaios, verificamos que a alta taxa de falsos positivos parece ser inerente a esses métodos de maneira geral. O Kit da Organon Teknica (EHEC-TEK), avaliado por JOHNSON, DURHAM *et al* [3], apresentou taxa de falsos positivos de 70% (97 cepas não confirmadas em 139 isoladas) em um teste e de 75% (15 cepas não confirmadas em 20 isoladas) em outro teste. JOHNSON, ROSE *et al* [2], que utilizaram o kit da 3M e um segundo imunoensaio na análise de produtos cárneos implicados em um surto nos Estados Unidos, relataram que a ocorrência de falsos positivos é bastante comum, embora não tenham determinado a porcentagem.

Método cultural - Kit Látex Test Oxoid. O teste de sorologia em látex da Oxoid foi desenvolvido e recomendado para a triagem de cepas sorbitol negativas isoladas a partir do Ágar MacConkey Sorbitol, conforme descrição do próprio catálogo do produto. Nessas condições, foi avaliado por diversos pesquisadores, com taxa de falsos positivos

relativamente baixa e restrita, na maioria dos casos, à cepas sorbitol negativas de *Escherichia hermanii*, *Enterobacter* sp, *Hafnia alvei* e *E.coli* de outros sorotipos que não o O157. Em nosso trabalho, a triagem inicial das cepas suspeitas seguiu um procedimento diferenciado, iniciando com o Petrifilm coliformes/*E.coli*, que não distingue as cepas sorbitol negativas das demais enterobactérias, passando para o Ágar Vermelho de Fenol Sorbitol-MUG, que revelou-se inadequado para distinguir as cepas sorbitol negativas, embora excelente para confirmação da β -glicuronidase. Assim, a população selecionada em nossas análises foi muito mais variada do que a normalmente avaliada nos trabalhos anteriores, o que provavelmente explica a grande diferença de resultados observada. Comparando-se a taxa de falsos positivos dos nossos testes em látex com os dos imunoensaios apresentados acima, em que o tipo sorológico também é determinado antes de uma seleção prévia em Ágar MacConkey Sorbitol, verificamos uma grande concordância, levando a crer que a incidência de enterobactérias capazes de reagir com o antisoro somático O157 é realmente alta.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DESMARCHELIER, P. M.; GRAU, F. H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. *et al.*(Ed.). **Foodborne microorganisms of public health significance**. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.
2. JOHNSON, J. L.; ROSE, B. E.; SHAAR, A. K. *et.al.* Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with food-borne disease outbreak. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 58, n. 6, p. 597-603, 1995.
3. JOHNSON, R. P.; DURHAM, R. J.; JOHNSON, S.T. *et al.* Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 386-388, 1995.

4. KARCH, H.; MEYER, T.; RÜSSMANN, H.; HEESEMANN, J. Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, p. 3464-3467, 1992.
5. MARTIN, D. R.; UHLER, P. M.; OKREND, A. J. G.; CHIU, J. Y. Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 57, p. 70-72, 1994.
6. MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T. *et al.* Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 51, p. 179-184, 1994.
7. OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E. R.; 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**, Georgia, v. 53, p. 936-940, 1990.
8. RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R.; BEZANSON, G. S.; KASATYA, S. Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, p. 2006-2012, 1988.
9. 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**, Georgia, v.58, n. 1, p. 7-12, 1995.
10. WILLSHAW, G. A.; THIRLWELL, J.; JONES, A. P. *et al.* Vero citotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 304-307, 1994.

Capítulo 3

Ocorrência de E. coli O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli O157:H7 pertence a um grupo de cepas patogênicas de *E.coli*, conhecidas como entero-hemorrágicas (EHEC) ou produtoras de verotoxina (VTEC). Essas linhagens caracterizam-se pela produção de uma toxina chamada de verotoxina (VT) ou toxina shiga (ST), similar à produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I [15]. A VT provoca uma doença chamada colite hemorrágica que, em casos mais graves, resulta em um quadro conhecido como síndrome urêmica hemolítica (HUS) [10]. As cepas EHEC podem pertencer a diferentes grupos sorológicos somáticos, mas a maioria das linhagens associadas à HUS são do sorotipo O157:H7 [16]. Essas cepas diferem das demais cepas de *E.coli* em algumas características, sendo mais importantes a não fermentação do sorbitol, a não produção da enzima β -glucuronidase e o crescimento pobre ou nulo a 44°C [9, 10, 11, 12].

O trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas entero-hemorrágicas de *E.coli* O157:H7 e *E.coli* O157:NM. Já foram incriminados em surtos, dentre outros alimentos, leite cru, carne bovina mal cozida e outros produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres e salsichas tipo “hot-dog”), frutas e vegetais (alface, melão, suco de maçã e diversos tipos de saladas) e maionese industrializada [3,6,14]. No geral, pode-se dizer que a carne bovina é uma das principais fontes potenciais de *E.coli* O157:H7, uma vez que o trato gastrointestinal de bovinos é o reservatório desses microrganismos [7].

E. coli O157:H7 é reconhecida como patógeno de origem alimentar desde 1982, respondendo por milhares de casos de diarreia e síndrome urêmica hemolítica (HUS) nos Estados Unidos, Europa e Japão. No Brasil, os resultados de nossa avaliação anterior, com 886 amostras de hambúrgueres provenientes de frigoríficos do sul e sudeste, analisadas no período de janeiro a dezembro de 1997, não detectou a presença desse patógeno. O presente estudo complementou esses resultados, verificando a ocorrência em outros produtos cárneos e no ambiente industrial. Também foi feita uma avaliação da sensibilidade dos métodos com cultura pura de *E. coli* O157:H7, injuriada e não injuriada, acompanhada ou não de uma cepa competidora comum de *E. coli*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

As amostras de produtos cárneos diversos e ambiente industrial foram coletadas em frigoríficos localizados nas regiões sul e sudeste do Brasil, no período de abril/98 a abril/99.

2.2. MÉTODOS DE ANÁLISE

Na determinação da ocorrência foi utilizado o método de imunoprecipitação da Neogem (Reveal *E.coli* O157 Test Kit). Na avaliação da sensibilidade o imunoensaio foi comparado com o método cultural, ambos descritos abaixo.

2.2.1. Método cultural - 25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo EC Modificado Novobiocina (mECn), incubadas por 6 horas em shaker com temperatura controlada a 37°C e, em seguida, incubadas em incubadora estática por mais 18 horas a 37°C. Uma alçada do caldo enriquecido foi estriada em placas de Ágar McConkey Sorbitol e, após incubação a 35°C/24h foram selecionadas colônias típicas para confirmação, que foi feita através do teste sorológico de aglutinação em lâmina com antisoro O157 (Probac do Brasil), atividade de β -glicuronidase em Caldo Lauril Sulfato Triptose suplementado com 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (LST-MUG), teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA) e, a partir dos tubos de TSI, provas bioquímicas utilizando-se o kit da BioMerieux (API 20E).

2.2.2. Ensaio de imunoprecipitação (Neogem Reveal *E.coli* O157) - 25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml do Caldo Neogem para *E.coli* O157 (Reveal media 8 hours 9760), incubadas por 8 horas em shaker com temperatura controlada a 41°C. O imunoensaio foi realizado com uma alíquota do caldo enriquecido, submetida à fervura, conforme instruções do fabricante. Todas as amostras sinalizadas pelo imunoensaio foram submetidas à confirmação, estriando-se uma alçada do caldo de enriquecimento original (8h de enriquecimento), em placas de Ágar McConkey Sorbitol. Após incubação a 35°C/24h foram selecionadas colônias típicas para confirmação, que foi feita seguindo o mesmo

procedimento utilizado no método cultural, incluindo-se o teste sorológico de aglutinação em lâmina com antisoro O157 (Probac do Brasil).

2.3. Determinação do limite de sensibilidade dos métodos

Foram feitos vários tipos de avaliações para determinar o limite de sensibilidade do método da Neogem, sempre em paralelo com o método cultural. Para a determinação preliminar do limite de sensibilidade do ensaio de imunoprecipitação propriamente dito, o imunoensaio da Neogem foi realizado com a cepa pura de *E.coli* O157:H7 suspensa em Caldo Neogem, com concentrações variando de 9,0 a 3,0 Log UFC/ml. Para a determinação do limite de sensibilidade da sequência completa do método foram feitas as seguintes avaliações:

a) Avaliação com cultura pura não injuriada - foi feita utilizando-se uma cepa de *E.coli* O157:H7 (ATCC 43890) inoculada nos caldos de enriquecimento antes do início da análise, em concentrações iniciais variando de 6,5 a menos de 0,5 Log UFC/ml de caldo. A sequência da análise seguiu as mesmas etapas descritas nos itens 2.2.1.e 2.2.2., dispensando-se a confirmação.

b) Avaliação com cultura pura injuriada - foi feita utilizando-se o mesmo procedimento seguido para a cepa não injuriada, com inóculo inicial variando de 2,1 a menos de 0,1 Log UFC/ml de caldo.

c) Avaliação com cultura mista não injuriada – foi feita utilizando-se a cepa de *E.coli* O157:H7 ATCC 43890 inoculada em concentrações iniciais variando de 5,5 a 3,5 Log UFC/ml de caldo, acompanhada de uma cepa de *E.coli* comum competidora (ATCC 25922), inoculada em concentrações iniciais variando de 1 a 100 vezes a da cepa de *E.coli* O157:H7. A sequência das análises seguiu as mesmas etapas descritas nos itens 2.2.1. e 2.2.2, dispensando-se as provas bioquímicas em API 20E.

d) Avaliação com cultura mista injuriada – foi feita seguindo-se o mesmo procedimento utilizado na avaliação com cultura mista não injuriada, porém, em concentrações iniciais da cepa competidora de 50 a 5.000 vezes a da cepa de *E.coli* O157:H7.

Em todos os casos a simulação de injúria foi feita por choque térmico sub-letal (banho-maria a 60°C/5min) e a quantificação da população final de *E.coli* O157:H7 e *E.coli* comum após o período de enriquecimento foi feita em Petrifilm coliformes/*E.coli* (3M Company).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1. Ocorrência de *E.coli* O157:H7 em produtos cárneos e ambiente industrial

Os resultados encontram-se sumariados no Quadro 1. Foram analisadas 340 amostras, não sendo detectada a presença de *E.coli* O157:H7 em nenhuma das amostras analisadas. Esses dados atestam, senão a ausência, pelo menos uma baixa frequência desse patógeno em nossa produção.

Quadro 1. Ocorrência de *E.coli* O157:H7 em amostras de produtos cárneos e ambiente industrial, coletadas em frigoríficos do sudeste do Brasil no período de abril de 1998 a abril de 1999.

Tipo amostra	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas
Hambúrguer	77	0
Lingüiça	148	0
Ambiente	115	0
Total	340	0

3.2. Determinação do limite de sensibilidade dos métodos utilizados

3.2.1. Na avaliação preliminar do limite de sensibilidade do ensaio de imunoprecipitação propriamente dito, o imunoensaio da Neogem foi realizado com a cepa pura de *E.coli* O157:H7 suspensa em Caldo Neogem, sendo a captura das células feita a partir de uma pequena alíquota (5 gotas) do caldo de enriquecimento. Observou-se que, para emissão de

um sinal claro, foi necessária uma contagem de *E.coli* O157:H7 na faixa de 10^6 - 10^8 UFC/ml, valor similar aos normalmente relatados para *Salmonella*, que também encontra-se na faixa de 10^6 - 10^8 /ml [13].

3.2.2. Os resultados da avaliação da sensibilidade dos métodos com cultura pura, utilizando-se uma cepa de *E.coli* O157:H7 não injuriada, adicionada ao caldo de enriquecimento com contagens iniciais variando de 4,5 a menos de 0,5 Log UFC/ml, encontram-se sumarizados no Quadro 2.

QUADRO 2. Resultados da avaliação do limite de sensibilidade do método cultural e do imunoensaio da Neogem (Reveal *E.coli* O157) na detecção de *E.coli* O157:H7 em cultura pura, utilizando-se inóculo não injuriado.

INÓCULO INICIAL ADICIONADO AO CALDO DE ENRIQUECIMENTO (LOG UFC/ML)	Método cultural Enriquecimento em Caldo mECn		Imunoensaio Reveal <i>E.coli</i> O157 Enriquecimento em Caldo Neogem		
	Contagem final (Log UFC/ml) ^a	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b	Contagem final (Log UFC/ml) ^c	Imunoensaio	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b
4,5	5,8	+	9,0	+	+
3,5	4,7	+	8,9	+	+
2,5	3,8	+	9,0	+	+
1,5	3,0	+	9,0	+	+
0,5	1,9	+	>8,8	+	+
<0,5	1,0	+	>7,8	+	+

^aContagem realizada a partir do caldo enriquecido a 35°C por 6 horas sob agitação seguido de 18h a 35°C sem agitação.

^bEstrias em Ágar MacConkey Sorbitol feitas a partir de uma alçada do caldo enriquecido. ^c Contagem realizada a partir do caldo enriquecido a 41°C por 8 horas sob agitação

No caldo EC Modificado Novobiocina (mECn) a contagem *E.coli* O157:H7 elevou-se em menos de dois ciclos logarítmicos após o período de enriquecimento, porém, mesmo assim,

em todos os casos foi possível a recuperação de colônias típicas no Ágar MacConkey Sorbitol. No caldo Neogem a contagem elevou-se a valores acima de 8,0 log UFC/ml em todos os casos, podendo-se obter um sinal positivo no imunoensaio e também a recuperação de colônias típicas na Ágar MacConkey Sorbitol. Comparado com o caldo mECn, os resultados evidenciaram que a velocidade de crescimento de *E.coli* O157:H7 foi muito maior no Caldo Neogem, permitindo levar a população aos níveis de detecção do imunoensaio mesmo a partir de contagens iniciais abaixo de 0,5 Log UFC/ml.

3.2.3. Os resultados da avaliação da sensibilidade dos métodos com cultura pura, utilizando-se uma cepa de *E.coli* O157:H7 submetida a injúria sub-letal (choque térmico a 60°C/5min), adicionada ao caldo de enriquecimento com contagens iniciais variando de 2,1 a menos de 0,1 Log UFC/ml, encontram-se sumarizados no Quadro 3.

QUADRO 3. Resultados da avaliação do limite de sensibilidade do método cultural e do imunoensaio da Neogem (Reveal *E.coli* O157) na detecção de *E.coli* O157:H7 em cultura pura com inóculo injuriado por injúria sub-letal (choque térmico em banho-maria a 60°C por 5 minutos).

INÓCULO INICIAL ADICIONADO AO CALDO DE ENRIQUECIMENTO (LOG UFC/ML)	Método cultural Enriquecimento em Caldo mECn		Imunoensaio Reveal <i>E.coli</i> O157 Enriquecimento em Caldo Neogem		
	Contagem final (Log UFC/ml) ^a	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b	Contagem final (Log UFC/ml) ^c	Imunoensaio	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b
2,1	3,3	+	7,4	+	+
1,1	2,5	+	6,1	+	+
0,1	1,0	+	6,1	+	+
<0,1	0,4	+	5,1	-	pobre

^aContagem realizada a partir do caldo enriquecido a 35°C por 6 horas sob agitação seguido de 18h a 35°C sem agitação.

^bEstrias em Ágar MacConkey Sorbitol feitas a partir de uma alçada do caldo enriquecido. ^c Contagem realizada a partir do caldo enriquecido a 41°C por 8 horas sob agitação.

No caldo EC Modificado Novobiocina (mECn) a contagem *E.coli* O157:H7 elevou-se em no máximo um ciclo logarítmico, porém, ainda assim, em todos os casos foi possível a recuperação de colônias típicas no Ágar MacConkey Sorbitol. No caldo Neogem a contagem elevou-se em mais de 5 ciclos logarítmicos, em todos os casos, porém, com inóculo inicial abaixo de 0,1 Log UFC/ml, não foi possível a obtenção de um sinal positivo no imunoensaio e a recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol foi muito pobre, com desenvolvimento de um número reduzido de colônias típicas. Nesse caso é possível que o inóculo transferido na alçada tenha sido muito pequeno.

3.2.4. Na avaliação da sensibilidade dos métodos com cultura mista sem injúria (Quadro 4) foi utilizado inóculo inicial de *E.coli* O157:H7 variando na faixa de 3,5 a 1,5 Log UFC/ml e proporção de 1:100, 1:10 e 1:1 entre as cepas de *E.coli* O157:H7 e *E.coli* comum.

QUADRO 4. Resultados da avaliação do limite de sensibilidade do método cultural e do imunoensaio da Neogem (Reveal *E.coli* O157) na detecção de *E.coli* O157:H7, acompanhada de uma cepa de *E.coli* comum (ATCC 25922) competidora, com inóculos não injuriados.

Inóculo inicial adicionado ao caldo de enriquecimento (Log UFC/ml)		Método cultural Enriquecimento em Caldo mECn		Imunoensaio Reveal <i>E.coli</i> O157 Enriquecimento em Caldo Neogem		
<i>E.coli</i> O157:H7	<i>E.coli</i> comum	Contagem final <i>E.coli</i> O157:H7 (log UFC/ml) ^a	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b	Contagem final <i>E.coli</i> O157:H7 (log UFC/ml) ^c	Imunoensaio	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b
3,5	5,5	5,7	+	7,7	+	+
3,5	4,5	5,2	+	8,7	+	+
3,5	3,5	4,9	+	9,1	+	+
2,5	4,5	3,0	+	7,7	+	+
2,5	3,5	3,7	+	8,8	+	+
2,5	2,5	3,8	+	8,9	+	+
1,5	3,5	2,5	+	7,0	+	+
1,5	2,5	2,7	+	8,9	+	+
1,5	1,5	2,6	+	8,6	8,6	+

^aContagem realizada a partir do caldo enriquecido a 35°C por 6 horas sob agitação seguido de 18h a 35°C sem agitação.

^bEstrias em Ágar MacConkey Sorbitol feitas a partir de uma alçada do caldo enriquecido. ^c Contagem realizada a partir do caldo enriquecido a 41°C por 8 horas sob agitação.

Em todas as situações testadas os dois métodos permitiram uma boa recuperação da cepa no Ágar MacConkey Sorbitol e o imunoensaio da Neogem foi capaz de sinalizar a presença de *E.coli* O157:H7 mesmo na presença de uma população competidora 100 vezes maior.

3.2.5. Nos testes com inoculação das duas culturas injuriadas (Quadro 5) foi mantida a faixa de inóculo inicial da *E.coli* O157:H7 mas a proporção entre as cepas passou para 1:5000, 1:500 e 1:50.

QUADRO 5. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE SENSIBILIDADE DO MÉTODO CULTURAL E DO ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA NEOGEM (REVEAL *E.coli* O157) NA DETECÇÃO DE *E.coli* O157:H7, ACOMPANHADA DE UMA CEPA DE *E.coli* COMUM (ATCC 25922) COMPETIDORA, COM INÓCULOS INJURIADOS POR INJÚRIA SUB-LETAL (CHOQUE TÉRMICO EM BANHO-MARIA A 60°C POR 5 MINUTOS).

INÓCULO INICIAL ADICIONADO AO CALDO DE ENRIQUECIMENTO (LOG UFC/ML)		Método cultural Enriquecimento em Caldo mECn		Imunoensaio Reveal <i>E.coli</i> O157 Enriquecimento em Caldo Neogem		
<i>E.coli</i> O157:H7	<i>E.coli</i> comum	Contagem final <i>E.coli</i> O157:H7 (log UFC/ml) ^a	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b	Imunoensaio	Contagem final <i>E.coli</i> O157:H7 (log UFC/ml) ^c	Recuperação no Ágar MacConkey Sorbitol ^b
3,5	7,2	>2,0	+	fraco	6,3	+
3,5	6,2	>2,0	+	+	6,3	+
3,5	5,2	2,8	+	+	6,6	+
2,5	6,2	2,0	+	-	>6,0	+
2,5	5,2	2,7	+	+	6,0	+
2,5	4,2	2,0	+	+	6,4	+
1,5	5,2	2,6	+	-	>5,0	+
1,5	4,2	1,5	+	+	>5,0	+
1,5	3,2	1,1	+	+	5,7	+

^aContagem realizada a partir do caldo enriquecido a 35°C por 6 horas sob agitação seguido de 18h a 35°C sem agitação. ^bEstrias em Ágar MacConkey Sorbitol feitas a partir de uma alçada do caldo enriquecido. ^c Contagem realizada a partir do caldo enriquecido a 41°C por 8 horas sob agitação.

Nesse caso, a população final de *E.coli* O157:H7 no Caldo Neogem manteve-se em faixas 10 a 1.000 vezes menores do que as obtidas com a cepa sem injúria e, no Caldo mECn, esse dado não pode ser bem avaliado porque as contagens finais ficaram abaixo das iniciais. A explicação provável para esse resultado é o fato de a elevação da população de *E.coli* O157:H7 no Caldo mECn não ser muito acentuada, dificultando a competição com a cepa de *E.coli* comum nas placas de Petrifilm. Ainda assim, os resultados mostraram que, em todas as combinações testadas, tanto o caldo Neogem quanto o caldo mECn permitiram a recuperação da *E.coli* O157:H7 no Ágar MacConkey Sorbitol, porém, o imunoensaio da Neogem não conseguiu sinalizar a presença da cepa nas combinações com proporção acima de 1:500. Cabe lembrar que, nos alimentos mais susceptíveis à contaminação por *E.coli* O157:H7, como hambúrgueres, lingüiças e outros produtos cárneos crus, a contagem de coliformes fecais temotolerantes (*E.coli*) permitida pela legislação brasileira é de $5,0 \times 10^3$ /g [1], de forma que, numa amostra no limite de tolerância, a presença de menos de 10 UFC/g de *E.coli* O157:H7 poderia não ser detectada pelo método da Neogem. Cabe ainda lembrar que a menor dose infectiva de *E.coli* O157:H7 conhecida encontra-se na ordem de 10 células/g [2, 4, 8], evidenciando o risco de não detecção do patógeno em produtos potencialmente capazes de provocar a doença.

4. CONCLUSÕES

Não foi detectada a presença de *E.coli* O157:H7 nas amostras analisadas. Embora esse resultado não possa ser interpretado como garantia da ausência nos produtos cárneos brasileiros, atesta que a ocorrência no Brasil é, certamente, mais baixa do que nos Estados Unidos, Europa e outros Japão, onde amostragens similares têm detectado a presença em 0,2 a 3,7% do total de amostras analisadas nos diferentes estudos [5].

O ensaio de imunoprecipitação da Neogem exigiu contagens mínimas de 10^6 a 10^8 UFC de *E.coli* O157/ml para a emissão de um sinal positivo inequívoco, deixando claro que, assim como todos os imunoensaios de captura desenvolvidos para *Salmonella* ou *Listeria*, até o momento, não tem sensibilidade para aplicação direta na amostra, sendo essencial a etapa de enriquecimento, para levar a contagem aos níveis de detecção.

Tanto o método cultural quanto o imunoensaio da Neogem foram capazes de detectar a presença de *E.coli* O157:H7 em cultura pura, injuriada ou não, em concentrações iniciais de menos de 0,5 Log UFCml do caldo de enriquecimento.

Tanto o método cultural quanto o imunoensaio da Neogem foram capazes de detectar a presença de *E.coli* O157:H7 em cultura mista com *E.coli* comum competidora, injuriada ou não, em concentrações iniciais de 1,5 Log UFCml do caldo de enriquecimento, até concentrações 500 vezes maior do competidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, 10 jan.2001. Seção 1, p. 45-87.
2. ATTENBOROUGH, M.; MATTHEWS, K. R. Food safety through the meat supply chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 144S-148S, 2000.
3. BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1996.
4. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 42, p. 258-263, 1993.
5. DESMARCHELIER, P. M.; GRAU, F. H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. *et al.*(Ed.). **Foodborne microorganisms of public health significance**. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.
6. ERICKSON, J. P.; STAMER, J. W.; HAYES, M. *et al.* An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low pH dressings. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 58, n. 10, p. 1059-1064, 1995.
7. KNIGHT, P. Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 59, n. 5, p. 247-250, 1993.

8. LIOR, H. *Escherichia coli* O157:H7 and verocitoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 14, n. 7, p. 378-382, 1994.
9. MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol MacConkey Medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colits. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 869-872, 1986.
10. MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T. *et al.* Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 51, p. 179-184, 1994.
11. OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E. R.; 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**, Georgia, v. 53, p. 936-940, 1990.
12. SHUTERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J.; BRAXTON, D. S. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, p. 29-49, 1995.
13. SILVA, N. Imunoensaios enzimáticos aplicados à detecção de *Salmonella* em alimentos. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 173-185, 1991.
14. TAUXE, R.; KRUSE, H.; HELDBERG, C. *et al.* 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**, Georgia, v. 60, n. 11, p. 1400-1408, 1997.
15. WEAGANT, S. D.; BRYANT, J. L.; JINNEMAN, K. G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 58, n. 1, p. 7-12, 1995.
16. WILLSHAW, G. A.; THIRLWELL, J.; JONES, A. P. *et al.* Vero citotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colits and haemolytic uraemic syndrome in Britain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 304-307, 1994.

Capítulo 4

Ocorrência de E. coli O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um habitante normal do trato intestinal dos animais (incluindo o homem) e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E. coli*, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E. coli* enteropatogênicas (EEC). Essas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes doenças de origem alimentar nos Estados Unidos, onde responderam por 7,4% dos surtos e 28,6% das mortes provocadas bactérias naquele país, no período de 1993 a 1997 [35].

Atualmente há seis classes de *E. coli* enteropatogênicas reconhecidas, dentre elas as cepas de *E. coli* O157:H7, que pertencem ao grupo das *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC) ou produtoras de verotoxina (VTEC). A patogenicidade das cepas EHEC parece estar associada a uma série de fatores, incluindo a produção de várias citotoxinas, coletivamente chamadas de verotoxinas (VTs) ou toxina shiga (Stx), similares à toxina produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I [20, 42]. As VTs provocam uma doença chamada de colite hemorrágica que, em casos mais graves, resulta em um quadro conhecido como síndrome urêmica hemolítica (HUS) [31]. A colite hemorrágica tem um período de incubação de 3 a 10 dias e duração de 2 a 9 dias. Os sintomas são diarreia sanguinolenta e dores abdominais severas e, de acordo com a literatura, cerca de 10-15% dos casos agravam-se até o quadro de HUS [19], situação em que ocorre destruição de eritrócitos e falha aguda dos rins, levando à necessidade de diálise, transplante dos rins ou morte [41, 42]. A dose infectiva é ainda desconhecida mas, através da compilação de dados de surtos investigados nos Estados Unidos, parece encontrar-se na faixa de 10 células por grama ou mililitro do alimento consumido [19].

O grupo EHEC tem mais de 60 sorotipos que produzem SLT, porém, de acordo com KARMALI [26], o sorotipo O157:H7 predomina, sendo o mais freqüentemente associado a surtos de colite hemorrágica e HUS. As principais características que distinguem *E. coli* O157:H7 das demais cepas de *E. coli* são o crescimento pobre ou nulo a 44°C e a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima β -glicuronidase [29, 31, 33, 38]. Em

função dessas diferenças, não são detectadas nas análises de coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP), que utiliza a fermentação da lactose a 44,5°C como característica confirmativa, nem nas análises diretas de *E.coli* utilizando substratos para a enzima β -glicuronidase.

Alimentos envolvidos em surtos

Nos Estados Unidos, de acordo com os dados do CDC (Center for Disease Control and Prevention) [35], os alimentos mais frequentemente implicados em surtos provocados por cepas de *E.coli* enteropatogênica, no período de 1993 a 1997, foram a carne bovina (25%) e as frutas, vegetais e saladas (20%). A US Food and Drug Administration [19] acredita que dentre as cepas enteropatogênicas envolvidas, *E.coli* O157:H7 seja a mais frequente, representando hoje o segundo agente etiológico de diarreia bacteriana nos Estados da costa do Pacífico.

E.coli O157:H7 foi implicada pela primeira vez em surto de doença de origem alimentar em 1982 e, nos anos seguintes, mais de 30 surtos foram registrados só nos Estados Unidos [22]. Em 1993 um grande surto envolvendo mais de 700 pessoas atingiu 4 estados norte americanos, com 51 casos de HUS e 4 mortes. O surto foi provocado pelo consumo de hambúrguer mal cozido em uma rede regional de restaurantes tipo “fast food”, chamando a atenção para a carne como fonte potencial desse microrganismo. A partir daí as pesquisas demonstraram que o trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas entero-hemorrágicas de *E.coli* O157:H7 [27]. Nesse tipo de animais, a incidência em fezes varia de 0 a 10% [16] e a carne bovina moída (hambúrguer), de maneira especial, tem sido o principal agente de surtos registrados nos Estados Unidos [19, 20] e países da Europa.

Nos últimos 10 anos, entretanto, aumentou significativamente o número de surtos associados com outros veículos além da carne, particularmente as frutas, os sucos de frutas, os vegetais e as saladas preparadas com vegetais. Em 1991 ocorreu um surto nos Estados Unidos em que 23 pessoas foram atingidas através do consumo de cidra de maçã não

pasteurizada [20]. Aparentemente, a cidra foi produzida com maçãs recolhidas do chão e contaminadas com esterco de bovinos.

Em 1993 ocorreu um surto no Estado do Oregon, EUA, provocado pelo consumo de melões e outros itens da mesa de saladas de um restaurante, aparentemente atingidos por contaminação cruzada através de produtos cárneos manipulados na cozinha [20].

Em 1995, 92 pessoas foram atingidas por um surto em Montana, EUA, provocado pelo consumo de alface contaminada com água de irrigação [4].

Em 1996 ocorreram dois surtos nos Estados Unidos, provocados pelo consumo de suco de maçã não pasteurizado. O primeiro atingiu pelo menos 70 pessoas, espalhadas por vários estados do oeste, com 3 casos de HUS e 1 morte [11]. O segundo atingiu 45 pessoas dos estados da Califórnia, Colorado, Columbia Britânica e Washington, com 12 casos de HUS e nenhuma morte [10].

Em 1996 também foram registrados 4 surtos em escolas primárias do Japão, envolvendo o consumo de saladas [3]. O maior deles ocorreu na cidade de Sakai, com mais de 5.500 pessoas atingidas pelo consumo de broto de rabanete, com 3 mortes registradas. Os demais ocorreram nas cidades de Gifu, com 379 pessoas atingidas pelo consumo de salada, Morioka, com 47 atingidos pelo consumo de salada e frutos do mar e Obihiro, com 157 atingidos também pelo consumo de salada.

Em 1997 ocorreram dois surtos nos Estados Unidos, provocados pelo consumo de broto de alfafa [12], um no estado de Michigan, com 60 pessoas atingidas (2 casos de HUS) e outro no Estado da Virgínia, com 48 pessoas atingidas e nenhum caso de HUS. Em 2000, novamente nos Estados Unidos, mais 58 pessoas foram atingidas por *E.coli* O157:H7, através do consumo de salada [4].

Resistência aos agentes de desinfecção de verduras e frutas

A frequência de implicação das frutas e vegetais em surtos provocados por *E.coli* O157:H7 levantou uma série de questões sobre a eficácia dos procedimentos de desinfecção desses produtos e foram realizados muitos trabalhos para avaliar a resistência das cepas de *E.coli*

O157:H7 aos princípios ativos mais comuns. Um levantamento geral desses estudos mostra uma variação muito grande nas condições dos ensaios que, além de não relatar acuradamente a metodologia utilizada, não padronizam variáveis importantes como o tipo de desinfetante, a concentração utilizada, o tempo de contato, a temperatura de contato, a forma de preparação do inóculo, a superfície inoculada e a forma de quantificar os sobreviventes, dentre outras.

TAKEUCHI & FRANK [39], por exemplo, avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio (200ppm de cloro residual livre/5min/22°C) sobre *E.coli* O157:H7 inoculada na superfície intacta e em cortes de folhas de alface, observando 0,3 e 0,4 reduções decimais, respectivamente. Os autores relataram uma variação experimental significativa nesse estudo, que atribuíram a diferenças fisiológicas entre as folhas de alface utilizadas nas repetições.

BEUCHAT *et al* [8], em estudo similar, obtiveram 0,87 reduções decimais e, segundo TAKEUCHI & FRANK [39], essa diferença em relação às 0,3 e 0,4 reduções obtidas em seu estudo podem ser atribuídas ao fato de o experimento de BEUCHAT *et al.* não ter utilizado uma etapa de neutralização do cloro, após o tempo de contato, bem como à variações no nível inicial do inóculo e tempo de contato das folhas com a suspensão contaminante.

BEUCHAT *et al.* [9] avaliaram o efeito do tratamento de sementes de alfafa com $\text{Ca}[\text{OCl}]_2$ (200ppm de cloro residual livre/22°C/15min) e observaram 1,3 reduções decimais na população de *E.coli* O157:H7 artificialmente inoculada. Elevando a concentração de cloro residual livre para 20.000ppm, nas mesmas condições, o número de reduções decimais passou para 2,6.

TAORMINA & BEUCHAT [40] também avaliaram o efeito do tratamento com 20.000ppm de cloro residual livre (10min de contato) sobre *E.coli* O157:H7 artificialmente inoculada em sementes de alfafa e obtiveram resultado similar, com 2,8 reduções decimais. Com 100ppm de cloro residual livre, nas mesmas condições, obtiveram 2,2 reduções.

Conforme destacado pelos próprios autores, a comparação dos resultados desses trabalhos é complicada e dificulta sobremaneira a conclusão sobre a eficácia dos desinfetantes. Em 2001 BEUCHAT e um grupo de pesquisadores de diversas instituições de pesquisa norte americanas publicaram um artigo de interesse geral no Journal of Food Protection [6], alertando para a necessidade de padronização de métodos para determinação da eficácia de desinfetantes contra microrganismos patogênicos em frutas e vegetais.

A AOAC dispõe de dois métodos para determinação da atividade bactericida de desinfetantes, os métodos de diluição de uso e suspensão, cuja principal diferença é a forma como os microrganismos são expostos à ação do desinfetante. No método de diluição de uso as células são fixados e secados em um suporte sólido (carreador) e no método de suspensão são suspensos na própria solução desinfetante. As principais vantagens desses métodos em relação à inoculação direta de frutas e vegetais é que todo o procedimento é criteriosamente padronizado, permitindo comparar resultados obtidos em qualquer laboratório do Brasil ou do exterior. O método de suspensão é mais simples, menos trabalhoso e mais barato do que o método de diluição de uso, razão pela qual foi selecionado para a realização desse trabalho, cujos objetivos foram efetuar um levantamento da ocorrência de *E.coli* O157:H7 em vegetais crus e avaliar sua resistência ao desinfetantes mais amplamente utilizados na desinfecção de verduras e de equipamentos e utensílios de restaurantes e cozinhas industriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ocorrência em vegetais

A amostragem foi feita em colaboração com três fornecedores de vegetais do CEASA Campinas (SP), coletando-se cerca de 30 amostras de vegetais por semana, no período de maio a outubro de 1999. Foram selecionadas para o trabalho amostras de alface, rúcula e chicória, que são normalmente consumidos na forma de salada crua. As amostras foram analisadas utilizando-se os “kits” de imunoensaio da 3M Company (EHEC Test Kit 3M

6477) ou da Neogem Corporation (Reveal *E.coli* O157 Test Kit), obedecendo ao seguinte procedimento:

2.1.1. ELISA 3M (EHEC Test Kit 3M 6477) - 25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo EC Modificado Novobiocina (mECn), preparado de acordo com a formulação descrita por OKREND *et al.* [34]. O caldo foi incubado a 37°C por 6 horas sob agitação e, em seguida, transferido para uma incubadora estática por mais 18 horas a 37°C. Conforme orientação do fabricante, uma alíquota de 1ml do caldo enriquecido foi então inoculada em Petrifilm coliformes/*E.coli* (3M Company) e, após incubação a 41°C/24h, foi verificada a presença ou não de colônias típicas de *E.coli* O157:H7 (colônias glicuronidase negativas, vermelhas, com presença de bolhas de gás). Nos casos em que se observou a presença de colônias típicas foi realizado o imunoensaio enzimático da 3M, seguindo a orientação dos fabricantes. Todas as amostras que apresentaram ELISA positivo foram submetidas à confirmação, estriando-se o caldo de enriquecimento original em placas de Ágar McConkey Sorbitol (Difco 0079). Após incubação a 35°C/24h foram selecionadas colônias típicas (sorbitol negativas, brancas) para confirmação, que foi feita através do teste sorológico de aglutinação em lâmina com o antisoro O157 (Probac do Brasil), atividade de β -glicuronidase em Caldo Lauril Sulfato Triptose suplementado com 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (LST-MUG Merck 12588), teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI Difco 0265) e teste de crescimento em Ágar Lisina Ferro (LIA Difco 0849). A partir dos tubos de TSI, as culturas presuntivas foram submetidas à provas bioquímicas adicionais, utilizando-se o kit API 20E da BioMerieux.

2.1.2. Imunoensaio Neogem (Reveal *E.coli* O157 Test Kit) - 25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml do Caldo Neogem para *E.coli* O157 (Reveal media 8 hours 9760) e incubadas a 41°C por 8 horas sob agitação. O imunoensaio foi realizado com uma alíquota do caldo enriquecido, submetido à fervura, conforme instruções do fabricante. Todas as amostras que apresentaram resultado positivo foram submetidas à confirmação,

estriando-se o caldo de enriquecimento original (8h de incubação) em placas de Ágar McConkey Sorbitol (Difco 0079). Após incubação a 35°C/24h foram selecionadas colônias típicas para confirmação, que foi feita seguindo o mesmo procedimento utilizado no método da 3M.

2.2. Avaliação da eficácia antimicrobiana de desinfetantes contra *E.coli* O157:H7

O teste de eficácia antimicrobiana foi feito de acordo com o método de suspensão N° 960.9 da Association of Official Analytical Chemists [5]. A eficácia foi verificada contra a cepa de *E.coli* O157:H7 ATCC 43890 e, para comparação, também contra *E.coli* ATCC 11229 (não patogênica), uma das cepas padrão no Brasil para teste de desinfetantes usados na indústria de alimentos [1]. Na realização dos testes foram utilizados os seguintes desinfetantes:

- Solução hipoclorito de sódio a 100 e 200mg/l (ppm), preparada em água destilada estéril a partir do produto comercial água sanitária Brilhante®. A concentração de cloro residual livre foi determinada por titulação com tiosulfato de sódio, de acordo com técnica descrita por EATON *et al* [17].
- Solução de dicloroisocianurato de sódio a 100 e 200mg/l, preparada em água destilada estéril a partir de produto comercial Aquatabs®. A concentração de cloro residual livre foi determinada conforme descrito anteriormente.
- Solução de cloreto de benzalcônio a 100 e 200mg/l, preparada em água destilada estéril a partir do produto comercial “Cloreto de Benzalcônio” P.A. (Vetec Código 1126). A concentração do princípio ativo na solução foi determinada de acordo com a metodologia descrita no Manual da Qualidade 65.3210.014 do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) [25].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ocorrência em vegetais

Os resultados do estudo da ocorrência de *E.coli* O157:H7 em vegetais encontram-se sumariados na Tabela 1. Foram analisadas 869 amostras, das quais 113 (13%) apresentaram teste presuntivo de imunoensaio positivo, sendo consideradas suspeitas. Nos testes bioquímicos e sorológicos posteriores, entretanto, a presença do patógeno nessas amostras não foi confirmada, representando uma taxa de falsos presuntivos de 13,6% nas análises realizadas com o Reveal *E.coli* O157 da Neogem e 11,8% das análises realizadas com o EHEC Test Kit da 3M.

Tabela 1. Ocorrência de *E.coli* O157:H7 em amostras de vegetais crus comercializados na região de Campinas (SP), no período de maio a outubro de 1999.

Método	Tipo de amostra analisada	Número de amostras analisadas	Número de amostras suspeitas ¹	Número de amostras confirmadas ²
Reveal <i>E.coli</i> O157 Neogem	Alface	289	43 (14,9%)	0
	Chicória	174	13 (7,5%)	0
	Rúcula	101	21 (20,8%)	0
	Total	564	77 (13,6%)	0
EHEC Test Kit 3M Company	Alface	109	12 (11%)	0
	Chicória	97	11 (11,3%)	0
	Rúcula	99	13 (13,1%)	0
	Total	305	36 (11,8%)	0
Total		869	113 (13%)	0

¹Amostras que apresentaram imunoensaio positivo.

²Amostras nas quais a presença de *E.coli* O157:H7 foi confirmada através de provas sorológicas e bioquímicas tradicionais.

É importante destacar que a base de dados do API 20E não diferencia as cepas O157 das demais cepas de *E.coli*, tendo sido utilizada, na interpretação dos resultados, a orientação de HALDANE *et al.* [23], segundo a qual a combinação mais típica dessas cepas nos 21 primeiros testes da cartela de resultados do API 20E (Figura 1) é “5144172” (91,9% das

cepas), podendo também ocorrer as combinações “5144152” (cepas sacarose negativas, 2,7%) e “5144162” (cepas rhamnose negativas, 5,4%).

+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL
5			1			4			4			1			7		2

Figura 1. Características típicas das cepas de *E.coli* O157:H7 no “Kit”API 20E da BioMérieux [23].

ONPG = orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosídeo (atividade de β-galactosidase), ADH = atividade de arginina dehidrolase, LDC = atividade de lisina descarboxilase, ODC = atividade de ornitina descarboxilase, CIT = utilização de citrato, H₂S = produção de H₂S, URE = atividade de urease, TDA = atividade de triptofano deaminase, IND = produção de indol, VP = produção de acetoina (teste de VP), GEL = atividade de gelatinase, GLU = fermentação/oxidação da glicose, MAN = fermentação/oxidação do manitol, INO = fermentação/oxidação do inositol, SOR = fermentação/oxidação do sorbitol, RHA = fermentação/oxidação da rhamnose, SAC = fermentação/oxidação da sacarose, MEL = fermentação/oxidação da melibiose, AMY = fermentação/oxidação da amigdalina, ARA = fermentação/oxidação da arabinose, OX = atividade de citocromo oxidase. Os números que acompanham o teste são os pontos a serem atribuídos quando o resultado for positivo, para compor a combinação numérica.

Levantamentos sobre a ocorrência de *E.coli* O157:H7 em alimentos são raramente encontrados na literatura, sendo mais comuns os relatos diretamente relacionados com surtos. Segundo KNIGHT [27] pesquisas em supermercados americanos revelaram *E.coli* O157:H7 em 1 a 2,5% das amostras de carne testadas (bovina, suína e de aves) e um levantamento realizado no México revelou contaminação em 19% dos vegetais analisados [6]. Numa compilação apresentada por DESMARCHELIER & GRAU [16], relatos de diferentes partes do mundo indicaram contaminação em 0,2% das carcaças de bovinos analisadas, 0 a 3,7% da carne bovina moída, 0 a 1,5% da carne de porco, 2% da carne de carneiro e 0 a 1,5% da carne de aves.

No Brasil não há dados sistemáticos que possam indicar a situação da ocorrência de *E.coli* O157:H7 em alimentos. Nosso trabalho inicial, com 886 amostras de hambúrgueres e 340 amostras de produtos cárneos e ambiente industrial, produzidos por frigoríficos do sul e sudeste, não detectou a presença de *E.coli* O157. Somados aos dados do levantamento com vegetais, revelam uma baixa frequência desse patógeno em nossos produtos, porém, devem ser interpretados cuidadosamente: Em primeiro lugar, assim como todos os dados de amostragem, não devem ser entendidos como garantia de ausência porque, ainda que o

tamanho das amostras seja da mesma ordem de grandeza encontrada em levantamentos similares fora do Brasil, está muito longe do tamanho da produção do país. Em segundo lugar, a qualidade microbiológica dos vegetais varia muito de região para região, sendo afetada pelas condições de cultivo, tratamento da água de irrigação, tratamento de esgotos e sistema de distribuição. Em nosso trabalho a amostragem foi feita apenas na cidade de Campinas, onde os vegetais apresentam, segundo dados de NASCIMENTO [32], boa qualidade sanitária e baixa contaminação por coliformes fecais, *E.coli* e *Salmonella*.

Além disso, o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE/SP) [15] registrou, no período de 1998 a 2000, 15 casos de HUS em hospitais públicos do Estado, com histórico anterior de diarreia e possível associação com *E.coli* O157:H7. Nos casos em que foi feita a coprocultura a presença de *E.coli* foi detectada mas o agente não foi isolado e/ou sorotipado para confirmação. Também no Rio Grande do Sul, um estudo retrospectivo de casos de HUS ocorridos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, no período de março de 1997 a agosto de 1999, apontou a existência de 31 casos da doença em crianças com idade de 2 a 57 meses [15]. Esses relatos atestam a existência de HUS no país e deixam clara a necessidade de monitoramento dessa bactéria em diferentes produtos e regiões, porque a experiência tem demonstrado que, num mercado globalizado, patógenos emergentes podem ser rapidamente disseminados pelo mundo, considerando-se a intensa movimentação internacional de pessoas e mercadorias. O CVE já implantou um sistema de vigilância ativa no Estado de São Paulo e, considerando-se que a maioria dos surtos relatados na literatura internacional foram veiculados por alimentos, é de grande interesse para a saúde pública que estudos de ocorrência continuem a ser efetuados em todas as regiões do país.

3.2. Resistência aos sanitizantes

Os resultados dos testes de resistência de *E.coli* O157:H7 (ATCC 43890) e *E.coli* comum (ATCC 11229) aos sanitizantes encontram-se sumariados na Tabela 2.

O método utilizado nas análises (teste de suspensão AOAC 960.9) preconiza como eficaz, na concentração testada, os sanitizantes que apresentarem 5 ou mais reduções decimais na população alvo, após 30 segundos de contato. De acordo com esse critério, todos os desinfetantes testados se mostraram eficazes contra *E.coli* O157:H7, nas concentrações de 100 e 200ppm. Esses resultados concordaram com os obtidos contra *E.coli* ATCC 11229 (cepa padrão recomendada pela AOAC para testes de eficácia antimicrobiana de desinfetantes de uso na indústria de alimentos), demonstrando que, nos testes realizados, as duas cepas apresentaram comportamento equivalente quanto à resistência a esses agentes de desinfecção. Esse resultado é importante para os profissionais responsáveis pelo controle de qualidade em restaurantes e cozinhas industriais, porque a análise de coliformes fecais e *E.coli* é relativamente simples e comum nos laboratórios das empresas, o que não acontece com a análise de *E.coli* O157:H7.

CHESCA [13] realizou um estudo comparativo da eficácia antimicrobiana de diversos desinfetantes contra as mesmas cepas de *E.coli* O157:H7 ATCC 43890 e *E.coli* comum ATCC 11229, artificialmente inoculadas em amostras de alface, observando que o tratamento com 200ppm de hipoclorito de sódio/15min promoveu uma média de 4,09 reduções decimais na população de *E.coli* comum e 2,70 reduções decimais na população de *E.coli* O157:H7. O tratamento com 200ppm de dicloroisocianurato de sódio/15min promoveu uma média de 3,69 reduções decimais na população de *E.coli* comum e 2,57 reduções decimais na população de *E.coli* O157:H7. A análise estatística não evidenciou diferença significativa entre os resultados obtidos contra *E.coli* O157:H7 e *E.coli* comum, comprovando que as duas cepas apresentaram resistência semelhante aos tratamentos de desinfecção com compostos de cloro. Por outro lado, esses valores de redução decimal são menores do que os obtidos em nosso trabalho, variação provavelmente devida à diferença na forma de exposição das células ao desinfetante, em suspensão, no nosso caso e fixadas às folhas de alface, no caso de CHESCA.

Tabela 2. Eficácia antimicrobiana de compostos de cloro e amônio quaternário contra *E.coli* comum (ATCC 11229) e *E.coli* O157:H7 (ATCC 43890), empregando-se o método AOAC 960.9.

Desinfetante	Concentração e tempo de contato	Contagem inicial, final e número de reduções decimais *					
		<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 43890 (log UFC/ml)			<i>E.coli</i> ATCC 11229 (log UFC/ml)		
		Inicial	Final	Reduções*	Inicial	Final	Reduções*
Dicloroisocianurato de sódio	100ppm/30s	9,1	<3,0	>6,1	8,8	<3,0	>5,8
	200ppm/30s	9,3	<3,0	>6,3	9,6	<3,0	>6,6
Hipoclorito de sódio	100ppm/30s	9,3	<3,0	>6,3	9,7	<3,0	>6,7
		9,4	<3,0	>6,4	9,7	<3,0	>6,7
	200ppm/30s	9,3	<3,0	>6,3	9,7	<3,0	>6,7
		9,4	<3,0	>6,4	9,7	<3,0	>6,7
Cloreto de benzalcônio	100ppm/30s	9,3	3,8	5,5	9,6	<3,0	>6,6
		9,7	3,9	5,8	9,7	<3,0	>6,7
	200ppm/30s	8,3	<3,0	>5,3	7,9	2,0	5,9
		9,7	<3,0	>6,7	9,7	<3,0	>6,7

* O número de reduções decimais é definido como [Log UFC da população inicial – Log UFC da população final].

É importante considerar, na interpretação de resultados obtidos pelo método de suspensão AOAC 960.0, as vantagens e as limitações da técnica. A principal vantagem é que o método é padronizado e reconhecido internacionalmente, de forma que os dados podem ser comparados, permitindo verificar se as cepas avaliadas apresentam diferença na resistência aos desinfetantes testados. A principal desvantagem é que o método não reproduz as condições de adesão e formação de biofilmes que se observa na prática de desinfecção de vegetais. Nessas condições, os resultados da literatura deixam claro que a eficácia dos desinfetantes, aplicados tanto à microbiota natural quanto à cepas de microrganismos artificialmente inoculadas em superfícies de frutas e verduras, é muito menor do que nos testes de suspensão. Além disso, mesmo que a característica de resistência das cepas aos diferentes princípios ativos dos desinfetantes seja similar, as diferenças nas características

de adesividade e formação de biofilmes podem interferir na eficácia dos desinfetantes [2, 14, 21, 24, 28, 30, 36, 37, 43]

Outro fator importante a considerar é o fato de desinfetantes com o mesmo princípio ativo, porém, de marcas comerciais distintas, apresentarem diferença na eficácia antimicrobiana [18]. Assim, é imprescindível o monitoramento periódico da qualidade dos produtos disponíveis no mercado, para garantir segurança dos tratamentos de desinfecção aplicados.

Considerando-se ainda a crescente participação dos vegetais na transmissão de *E.coli* O157:H7 e as evidências de que, no Brasil, casos de HUS podem estar sendo veiculados por alimentos, é importante que sejam conduzidos novos estudos para avaliar a resistência de outras cepas de *E.coli* O157:H7 aos diferentes desinfetantes disponíveis no mercado. Ainda mais importante é que esses estudos sejam conduzidos com métodos padronizados, que reproduzam as condições experimentais, de forma que os resultados possam ser comparados e utilizados na tomada de decisões pelos agentes de saúde e controle de qualidade.

4. CONCLUSÕES

Não foi detectada a presença de *E.coli* O157:H7 em nenhuma das amostras de vegetais analisadas, corroborando resultados já obtidos para produtos cárneos. Embora esses resultados não possam ser interpretados como garantia de ausência desse patógeno no país, atesta que a ocorrência em nosso meio é, certamente, mais baixa do que em outros países.

Nosso estudo demonstrou que tanto o cloreto de benzalcônio quanto o hipoclorito e o dicloroisocianurato de sódio são eficazes na destruição de *E.coli* O157:H7 em suspensão, nas concentrações de 100 e 200ppm, após 30s de contato. Demonstrou também que a resistência da cepa de *E.coli* O157:H7 ATCC 43890 a esses desinfetante é similar à resistência da cepa padrão AOAC para ensaios de eficácia antimicrobiana, *E.coli* ATCC 11229. Assim, é razoável supor que, no monitoramento dos processos de desinfecção de verduras em restaurantes e cozinhas industriais, acompanhar a redução na contagem de

E.coli ou coliformes fecais depois da desinfecção seja suficiente para avaliar a segurança dos tratamentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). PORTARIA 336 de 22 de julho de 1999. **Regulamenta o Registro de Produtos Saneantes Domissanitários e Afins, de Uso Domiciliar, Institucional e Profissional**. Brasília: Diário Oficial da União, 30 jul. 1999. Seção 1.
2. ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.
3. ANÔNIMO. **Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E.coli*) infections, Japan, 1996-June 1997**. Disponível em: <<http://idsc.nih.gov/iasr/18/209/tpc209.html>>. Acesso em 20 abr. 2001.
4. ANÔNIMO. **About *E.coli* - history, prevention, symptoms & risks, recent outbreaks**. Disponível em: <<http://www.about-ecoli.com>>. Acesso em 22 abr. 2001.
5. BELOIAN, A. Disinfectants. In: **AOAC Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg: Association Of Official Analytical Chemists, 1998. Cap. 6.
6. BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1996.
7. BEUCHAT, L. R.; FARBER, J. M.; GARRETT, E. H. *et al.* Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 64, n. 7, p. 1079-1084, 2001.

8. BEUCHAT, L. R.; NAIL, B. V.; ADLER, B. B.; CLAVER, M. R. S. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 61, n. 10, p. 1305-1311, 1998.
9. BEUCHAT, L. R.; WARD, T. E.; PETTIGREW, C. A. Comparison of chlorine and a prototype produce wash product for effectiveness in killing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 64, n. 2, p. 152-158, 2001.
10. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice – British Columbia, California, Colorado and Washington, October 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 45, n. 44, p. 975, 1996.
11. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider – Connecticut and New York, October 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 46, n. 01, p. 4-8, 1997.
12. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating alfalfa sprouts – Michigan and Virginia, June-July 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 46, n. 32, p. 741-744, 1997.
13. CHESCA, A. C. ***Enterobacteriaceae* em alface (*Lactuca sativa*) e eficácia de sanitizantes**. Jaboticabal, 2002. 76 p. Tese (Doutor em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
14. COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície inoxidável**. Rio de Janeiro, 1999. 81 p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Veterinária) – Universidade Rural do Rio de Janeiro.
15. CVE/SP. **Informe-Net DTA -Doenças transmitidas por alimentos**. Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2001.

- Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dta_menu.htm>. Acesso em 15 jan. 2001.
16. DESMARCHELIER, P. M.; GRAU, F. H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. *et al.* (Ed.). **Foodborne microorganisms of public health significance**. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p.231-264.
 17. EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.(Ed.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. Washington: American Public Health Association (A.P.H.A.), American Water Works Association (A.W.W.A.), Water Environment Federation (W.E.F.), 1995. Paginação irregular.
 18. EIROA, M. N. U.; PORTO, E. Evaluation of different chlorine based disinfectants and vinegar against *Vibrio cholerae* present in lettuce. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 25,n. 2, p. 169-172, 1995.
 19. FDA/CFSAN. *Escherichia coli* O157:H7. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook (The “Bad Bug Book”)**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2001. Cap. 15. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/badbug.zip>>. Acesso em 20/03/01.
 20. FENG, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel vehicles of infections and emergence of phenotypic variantes. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 1, n. 2, p. 1-9, 1995. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/feng.htm>>.
 21. FRANK, J. H.; KOFI, R. A surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 53, n. 7, p. 550-554, 2000.
 22. GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterhemorrhagic *E.coli*, and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 13, p. 60-98, 1991.
 23. 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, n. 4, p. 652-653, 1986.
24. HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 60, n. 9, p. 1034-1037, 1997.
 25. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro, 1999.
 26. KARMALI, M. A. Infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 2, p. 15-38, 1989.
 27. KNIGHT, P. Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 59, n. 5, p. 247-250, 1993.
 28. LeCHEVALIER, M. W.; BABCOCK, T. M.; LEE, R. G. Examination and characterization of distribution system biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 12, p. 2714-2724, 1987.
 29. MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol MacConkey Medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 869-872, 1986.
 30. MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 56, n. 1, p. 34-41, 1993.
 31. MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T. *et al.* Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 51, p. 179-184, 1994.
 32. NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. Araraquara, 2002. 79 p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

33. OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E.; BENNET, B. A. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 53, p. 249-252, 1990.
34. 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**, Georgia, v. 53, p. 936-940, 1990.
35. OLSEN, S. J.; MacKINON, L. C.; GOULDING, J. S. *et al.* Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, 2000.
36. PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar**: avaliação por microscopia de epifluorescência. Viçosa, 1998. 57 p. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.
37. RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.
38. SHUTERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J.; BRAXTON, D. S. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, p. 29-49, 1995.
39. TAKEUCHI, K.; FRANK, J. F. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 64, n. 2, p. 147-151, 2001.
40. TAORMINA, P. J.; BEUCHAT, L. R. Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfafa seeds. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 62, n. 4, p. 318-324, 1999.

41. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Escherichia coli* O157:H7: issues and ramifications. Colorado: Center for Epidemiology and Animal Health, 1994. 48p.
42. 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**, Georgia, v. 58,n. 1, p. 7-12, 1995.
43. WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Georgia, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

Conclusões

No total, nosso monitoramento de *E. coli* O157:H7 analisou, no período de janeiro de 1997 a outubro de 1999, 2.095 amostras de alimentos, incluindo 1.111 de produtos cárneos, 115 do ambiente industrial e 869 de vegetais. Em nenhuma amostra foi detectada a presença de *E. coli* O157:H7. Essa amostragem é pequena, comparada com o volume de produção do país, mas os resultados indicam que a ocorrência no Brasil deve ser bem mais baixa do que em outros países, onde amostragens similares têm detectado a presença em 0,2 a 3,7% das amostras analisadas.

Na realização dos ensaios se observou que várias enterobactérias são capazes de aglutinação com o antissoro O157 (reações cruzadas), resultando em falsos presuntivos. Nossos resultados mostraram que esse problema pode ser bastante reduzido se o teste sorológico for feito após uma triagem das cepas sorbitol negativas. O meio de cultura que se mostrou mais adequado para isso foi o Ágar MacConkey Sorbitol.

Como consequência das reações cruzadas, em 8,2% das amostras foram detectadas enterobactérias capazes de aglutinação com o antisoro O157. Essas cepas não foram confirmadas como *E.coli* O157:H7 na identificação posterior, representando uma taxa de falsos presuntivos de 6,1% nas análises realizadas pelo método cultural clássico, 6,3% nas análises realizadas pelo imunoensaio enzimático da 3M Company (EHEC Test Kit 6477) e 13,2 nas análises realizadas pelo imunoensaio enzimático da Neogem (Reveal *E.coli* O157 Test Kit).

Nossos resultados mostraram que o ensaio de imunoprecipitação da Neogem não tem sensibilidade para aplicação direta nos alimentos. A contagem mínima de células exigida para emissão de um sinal positivo foi 10^6 a 10^8 UFC de *E.coli* O157/ml, tendo sido essencial uma etapa de enriquecimento, para levar a contagem aos níveis de detecção.

Os resultados também mostraram que o método cultural e o imunoensaio da Neogem são capazes de detectar *E.coli* O157:H7 em cultura pura (injuriada ou não) em concentrações iniciais de menos de 0,5 Log UFCml do caldo de enriquecimento. No caso de culturas mistas, são capazes de detectar a presença em concentrações iniciais de 1,5 Log UFCml do caldo de enriquecimento, na presença de concentrações até 500 vezes maior dos competidores.

Finalmente, nosso estudo demonstrou que o cloreto de benzalcônio e os compostos de cloro (hipoclorito e o dicloroisocianurato de sódio) são eficazes na destruição de *E.coli* O157:H7 em suspensão, nas concentrações de 100 e 200ppm, após 30s de contato. Demonstrou também que a resistência de *E.coli* O157:H7 a esses desinfetante é similar à da *E. coli* comum.