

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

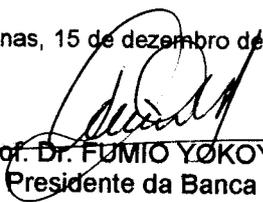
**“FATORES QUE AFETAM A RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DE  
*Escherichia coli* O157:H7 TERMICAMENTE INJURIADAS”**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por RENATA BROMBERG aprovada pela Comissão Julgadora em 15 de dezembro de 1997.

Campinas, 15 de dezembro de 1997.

**Renata Bromberg**

  
Prof. Dr. FUMIO YOKOYA  
Presidente da Banca

**Orientador: Prof. Dr. Fumio Yokoya  
Co-orientador: Dr. Michael William Peck**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de doutor em Ciências de Alimentos**

1997



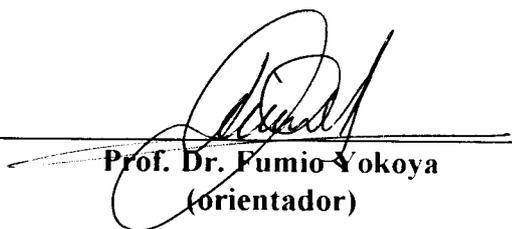
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
COMBO BC	32576
PROC.	395193
C	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> I
PREÇO	R\$ 13,00
DATA	16/12/98
N.º CPD	

CM-00104793-9

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

B787f	<p>Bromberg, Renata Fatores que afetam a recuperação de células de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 termicamente injuriadas / Renata Bromberg. -- Campinas: SP [s.n.], 1997.</p> <p>Orientador: Fumio Yokoya Co-orientador: Michael William Peck Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Bacteriologia - alimentos. 3. Bactéria - tratamento térmico. 4. Reação de óxido - redução. I. Yokoya, Fumio. II. Peck, Michael William. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p>
-------	---

## BANCA EXAMINADORA



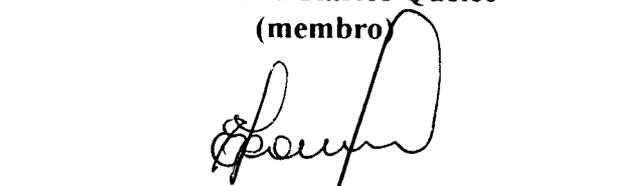
---

**Prof. Dr. Fumio Yokoya**  
(orientador)



---

**Prof. Dr. Clarice Queico**  
(membro)

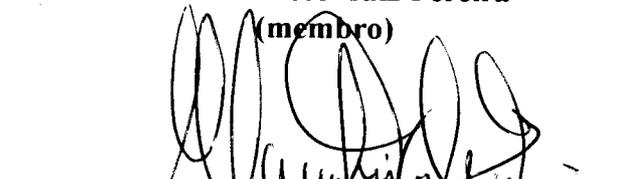


---

**Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva**  
(membro)

---

**Prof. Dr. José Luiz Pereira**  
(membro)



---

**Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão**  
(membro)

---

**Prof. Dr. Pilar Rodriguez de Massaguer**  
(membro)



---

**Prof. Dr. Tomomasa Yano**  
(membro)

Campinas, de

de 1997.

**Aos meus pais  
pelo carinho e pela compreensão.**

**Ao Marcos  
pelo apoio e incentivo.**

**Dedico.**

# AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya, pela orientação e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, que proporcionou as condições necessárias para a realização dos estudos.

Ao Centro de Tecnologia de Carnes, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado, indispensável para a execução deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, pela correção e enriquecimento do trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em especial a Creuza Kasume Nomura, pela correção das referências bibliográficas.

À Maria Raquel Oriane, pela amizade e colaboração na correção do texto.

Ao Antonio Marcos Pupin, que me acompanhou em todos os momentos e me encorajou a realizar este trabalho.

Aos colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente do laboratório de Microbiologia, e do Instituto de Tecnologia de Alimentos, que de uma forma ou de outra me auxiliaram nestes anos.

Aos amigos, Andrea Viana, Cláudia Losano, Marcelo Zanandré, Raquel Schramm, Regina Lemos, Ana Lúcia Lemos, Daniela Munhoz, que me incentivaram a vencer as dificuldades e atingir meus objetivos.

Meu carinho e gratidão.

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank my supervisor in United Kingdom, Dr. Michael William Peck, for his competent advise and valuable suggestions during the research.

I am particularly grateful to Susie George for her expert assistance, friendship and who was sublimely patient to answer me "just one more question"....

I express gratitude to Ola Symes for her helpful assistance in media preparation and friendship.

The Institute of Food Research is highly acknowledged for allowing me to the development of this work.

Finally, I would like to thank my other colleagues from the Institute of Food Research, in particular to Ann Graham, who kindly provided me everything necessary to my staying in Norwich.

# ÍNDICE

Índice .....	i
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Resumo.....	viii
Summary.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Características gerais de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	5
2.1.1 <i>Descrição</i> .....	5
2.1.2 <i>Perspectiva histórica</i> .....	7
2.1.3 <i>Toxinas</i> .....	10
2.1.4 <i>Mecanismo de infecção</i> .....	12
2.1.5 <i>Manifestações clínicas</i> .....	14
2.1.6 <i>Fatores de risco relacionados a doenças causadas por E. coli O157:H7</i> .....	16
2.1.7 <i>Características bioquímicas e de crescimento</i> .....	17
2.1.8 <i>Procedimentos de detecção e isolamento</i> .....	19
2.1.9 <i>Transmissão/incidência em alimentos</i> .....	21
2.1.10 <i>Medidas de prevenção e controle de infecções por E. coli O157:H7</i> .....	24
2.1.11 <i>Características de sobrevivência de E. coli O157:H7</i> .....	26
2.1.11.1 <i>pH e acidulantes</i> .....	26
2.1.11.2 <i>Atividade de água e sais</i> .....	27
2.1.11.3 <i>Baixas temperaturas</i> .....	28

2.1.11.4. Irradiação .....	29
2.1.11.5. Tratamento térmico .....	29
2.2. Injúria bacteriana .....	31
2.2.1. Fatores que interagem com células bacterianas injuriadas por tratamento térmico .....	34
2.2.2. Fatores que influenciam na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 termicamente injuriadas.....	35
2.2.2.1. Atmosfera gasosa .....	35
2.2.2.2. Embalagens sob atmosfera modificada .....	36
2.2.2.3. Enzimas.....	39
2.2.2.4. Potencial de óxido-redução .....	44
2.2.2.5. Choque térmico .....	46
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
3.1. Microrganismo .....	50
3.2. Preparo dos meios .....	50
3.2.1. Meios de cultura .....	50
3.2.2. Meio de cultura a base de alimentos.....	51
3.3. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 sob condições aeróbias e anaeróbias.....	54
3.4. Preparo de suspensão celular para tratamento térmico .....	55
3.5. Tratamentos térmicos .....	55
3.5.1. Em meio de cultura.....	55
3.5.2. Em meios a base de alimentos .....	57
3.6. Avaliação dos tratamentos térmicos aplicados em alimentos.....	58
3.7. Detecção do crescimento .....	58
3.7.1. Em meios de cultura.....	58
3.7.2. Em meios a base de alimentos .....	60

3.8. Efeito das temperaturas equivalentes de tratamento térmico na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	61
3.9. Efeito do cultivo, tratamento térmico e incubação sob condições aeróbias ou anaeróbias, na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	62
3.10. Efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico .....	63
3.11. Efeito de gás carbônico e diferentes concentrações de oxigênio na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico .....	63
3.12. Efeito do choque térmico na resistência térmica de células de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	64
3.13. Medição do potencial de óxido-redução e pH .....	64
3.14. Medida da composição do espaço-livre dos meios .....	68
3.14.1. Em meio de cultura.....	68
3.14.2. Em meio a base de alimentos .....	69
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
4.1. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 sob condições aeróbias e anaeróbias.....	70
4.2. Determinação do tempo necessário para o aquecimento e resfriamento dos meios de tratamento térmico .....	70
4.3. Determinação das condições de tratamento térmico para células de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	74
4.4. Efeito do cultivo, tratamento térmico e incubação em condição de anaerobiose na recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7.....	82
4.5. Efeito do cultivo, tratamento térmico e incubação sob condições aeróbias, na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	84
4.6. Monitoramento do potencial de óxido-redução de meios contendo células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico.....	86
4.7. Efeito das temperaturas equivalentes de tratamento térmico, na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7.....	90

4.8. Efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de anaerobiose.....	93
4.9. Efeito de diferentes concentrações de oxigênio, na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de anaerobiose .....	96
4.10. Efeito de gás carbônico na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de anaerobiose .....	99
4.11. Efeito do choque térmico na resistência térmica e recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico sob condições de anaerobiose .....	101
4.12. Medida da composição do espaço-livre, potencial de óxido-redução e pH dos meios de cultura e alimentos .....	105
4.13. Detecção de crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos.....	108
4.14. Efeito do tratamento térmico de <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos .....	109
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>115</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Proporção água:alimento utilizada no preparo dos meios.....	54
TABELA 2. Valores do potencial de óxido-redução e de pH de meio TSYGB preparado sob diferentes misturas gasosas. ....	89
TABELA 3. Composição do espaço-livre de meios de cultura preparados sob diferentes misturas gasosas. ....	97
TABELA 4. Características dos alimentos preparados sob condições aeróbias e anaeróbias. ....	107
TABELA 5. Sumário dos tratamentos térmicos aplicados a <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos. ....	110
TABELA 6. Valores D de <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos preparados sob condições aeróbias e anaeróbias. ....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Preparo de meio TSBYGB para <i>E. coli</i> O157:H7 de acordo com a técnica de Hungate.....	52
FIGURA 2. Tratamento térmico de <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos.....	59
FIGURA 3. Variação do potencial de óxido-redução do tampão de quinidrina pH 4 em função da temperatura.....	65
FIGURA 4. Variação do potencial padrão de óxido-redução do eletrodo de referência em função da temperatura.....	66
FIGURA 5. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 sob condições aeróbias e anaeróbias incubação a 30°C.....	71
FIGURA 6. Tempo necessário para que 10 ml de meio TSBYGB contido em tubo atinja a temperatura de equilíbrio de 59°C.....	72
FIGURA 7. Tempo necessário para que 100 ml de meio TSYGB contido em frasco atinja a temperatura de equilíbrio de 59°C.....	73
FIGURA 8. Tempo necessário para que 10 ml de meio TSBYGB contido em tubo atinja a temperatura de resfriamento de 30°C.....	75
FIGURA 9. Tempo necessário para que 100 ml de meio TSBYGB contido em frasco atinja a temperatura de resfriamento de 30°C.....	76
FIGURA 10. Efeito da inoculação de 0,1 ml de suspensão de <i>E. coli</i> O157:H7 na temperatura de 10 ml de meio TSBYGB pré-aquecido a 59°C.....	77
FIGURA 11. Efeito da inoculação de 1 ml de suspensão de <i>E. coli</i> O157:H7 na temperatura de 100 ml de meio TSBYGB pré-aquecido a 59°C.....	78
FIGURA 12a. Curva de inativação térmica de <i>E. coli</i> O157:H7 a temperatura de 55°C.....	79
FIGURA 12b. Curva de inativação térmica de <i>E. coli</i> O157:H7 a temperatura de 59°C.....	80
FIGURA 12c. Curva de inativação térmica de <i>E. coli</i> O157:H7 a temperatura de 61°C.....	81
FIGURA 13. Efeito da incubação em anaerobiose a 30°C de células de <i>E. coli</i> O157:H7, submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos, e enumeradas em meio aeróbio e anaeróbio.....	83

FIGURA 14. Efeito da incubação em aerobiose a 30°C de células de <i>E. coli</i> O157:H7, submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos, e enumeradas em meio aeróbio e anaeróbio.....	85
FIGURA 15. Variação no potencial de óxido-redução da cultura de <i>E. coli</i> O157:H7 incubada a 30°C.....	87
FIGURA 16. Efeito do tratamento térmico na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 incubadas em condições de anaerobiose a 30°C.....	92
FIGURA 17. Efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos.....	94
FIGURA 18. Efeito do tratamento térmico em condições de anaerobiose a 59°C por 5 minutos e temperatura de incubação a 30°C, no crescimento de células de <i>E. coli</i> O157:H7 em presença de diferentes concentrações de oxigênio.....	98
FIGURA 19. Efeito do tratamento térmico em condições de anaerobiose a 59°C por 5 minutos e temperatura de incubação a 30°C, no crescimento de células de <i>E. coli</i> O157:H7 em presença de 50%CO <sub>2</sub> .....	100
FIGURA 20. Efeito do choque térmico a 42°C por 5 minutos, na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a posterior tratamento térmico a 59°C e incubadas sob anaerobiose a 30°C.....	102
FIGURA 21. Efeito do choque térmico a 45°C por 5 minutos, na recuperação de células de <i>E. coli</i> O157:H7 submetidas a posterior tratamento térmico a 59°C e incubadas sob anaerobiose a 30°C.....	103
FIGURA 22. Curvas típicas de tratamento térmico para <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos.....	111

## RESUMO

Um método popular de se prolongar a vida-de-prateleira de alimentos minimamente processados é através da utilização de tratamentos térmicos brandos e embalagem com atmosfera modificada (com baixas concentrações de oxigênio). Tradicionalmente, a eficácia dos tratamentos térmicos aplicados a estes alimentos é medida através da contagem em aerobiose das células injuriadas pelo calor. Contudo, no caso da bactéria *Escherichia coli* O157:H7, obtém-se uma melhor recuperação das células subletalmente injuriadas quando se utiliza técnicas estritamente anaeróbias.

Estudou-se o efeito do tratamento térmico brando em células de *E. coli* O157:H7 e as condições de recuperação da sua sensibilidade ao oxigênio em meio de cultura e em meio a base de alimentos. Células de *E. coli* O157:H7 em fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio triptona de soja acrescido de 0,3% de extrato de levedura e 1% de glicose (TSYGB) a 30°C durante 24 horas, e submetidas a tratamento térmico a 59°C durante 5 minutos sob condições anaeróbias, recuperaram sua habilidade de crescer em presença de oxigênio em 6 horas. Similarmente, quando as células foram submetidas a tratamento térmico e mantidas em presença de 20% de oxigênio, estas apresentaram maior sensibilidade ao oxigênio, necessitando de um período maior de tempo para se recuperar do que as células mantidas em condições de anaerobiose (9 horas comparado a 6 horas).

Células de *E. coli* O157:H7 foram submetidas a tratamentos térmicos de letalidade equivalente a 55, 59 e 61°C. Após tratamento térmico a 55°C por 100 minutos, as células necessitaram de mais de 20 horas para recuperar sua tolerância ao oxigênio, comparativamente a 6 e 2 horas para as células tratadas termicamente a 59°C por 5 minutos e a 61°C por 1 minuto, respectivamente. Isto indica, que as células deste microrganismo recuperam sua sensibilidade ao oxigênio mais rapidamente após tratamentos térmicos mais curtos com temperaturas mais altas.

Células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico a 59°C durante 5 minutos e incubadas a 10, 20 e 30°C, recuperaram sua tolerância ao oxigênio após aproximadamente 130, 50 e 6 horas, respectivamente. Contudo, quando mantidas a 5°C, estas células não recuperaram sua tolerância, sobrevivendo no mesmo nível durante o período de observação de 34 dias.

A inclusão de 50% de dióxido de carbono ao meio de contagem, não apresentou efeito na recuperação das células sensíveis ao oxigênio, porém o aumento da concentração de oxigênio afetou a recuperação das células injuriadas.

O choque térmico a 42°C durante 5 minutos, seguido de tratamento térmico a 59°C durante 5 minutos não influenciou a resistência térmica ou o reparo celular de *E. coli* O157:H7. Entretanto, células deste microrganismo submetidas a choque térmico a 45°C durante 5 minutos, apresentaram um aumento em sua resistência térmica de cerca de 10 vezes, tanto em condições aeróbias como anaeróbias, não afetando porém, sua sensibilidade ao oxigênio.

*E. coli* O157:H7 foi inoculada em tubos contendo meios a base de alimentos, preparados em condições aeróbias e anaeróbias. Estes foram submetidos a tratamentos térmicos e incubados a 30°C. Foi verificada uma grande diferença na resistência térmica das células nos diferentes alimentos testados. Os valores  $D_{59^\circ\text{C}}$  nos tubos preparados em anaerobiose foram, para carne bovina 5,3 minutos, cogumelo 4 minutos, frango 3,7 minutos e de apenas 1,9 minutos para leite. Os valores  $D$  nos meios preparados em aerobiose foram similares aos obtidos no meio anaeróbio. Isto ocorreu porque os meios preparados em condições aeróbias apresentam potenciais de oxido-redução reduzidos, similares aos meios preparados em anaerobiose. Não se detectou crescimento de *E. coli* O157:H7 em meios preparados a base de batata, brócolis e cenoura.

## SUMMARY

A popular method of extending the shelf life of minimally processed foods is to subject the food to a mild heat treatment and package under a modified atmosphere (low level of oxygen). The effectiveness of the heat treatment is measured by aerobic enumeration of heat damaged cells. However, for *Escherichia coli* O157:H7, the greatest recovery of sublethally damaged cells was obtained using strictly anaerobic techniques.

The effect of a mild heat treatment and the recovery conditions on oxygen sensitivity of *E coli* O157:H7 cells was studied in media and foods. Stationary phase cells grown in tryptone soy agar with 0.3% yeast extract and 1% glucose (TSYGB) at 30°C for 24 hours and heat treated at 59°C for 5 minutes recovered their ability to grow in oxygen in 6 hours when held in anaerobic conditions. Similarly when cells were heat treated and held in the presence of 20% oxygen, the cells were more sensitive to oxygen and took longer to recover than cells held in anaerobic conditions (9 hours compared with 6 hours).

Cells of *E coli* O157:H7 were subjected to heat treatments of equivalent lethality at 55, 59 and 61°C. Following a heat treatment of 100 minutes at 55°C, cells took 20 hours to recover their tolerance to oxygen compared to 6 and 2 hours for cells heat treated for 5 minutes at 59°C and 1 minute at 61°C, respectively. This shows that injured cells recover their oxygen tolerance faster after a short heat treatment at a higher temperature.

Cells heat treated at 59°C for 5 minutes and held at 10, 20 and 30°C, recovered their oxygen tolerance after 130, 50 and 6 hours respectively. However, when held at 5°C, the cells did not recover their oxygen tolerance in 34 days.

The inclusion of 50% carbon dioxide in the enumeration medium had no effect on the recovery of oxygen sensitive cells but oxygen concentration affected the recovery of injured cells

A heat shock of 5 minutes at 42°C had no effect on heat resistance or recovery of damaged cells. However, 5 minutes at 45°C before a heat treatment of 5 minutes at 59°C increased the heat resistance of *E. coli* O157:H7 by 10 fold but had no effect on its oxygen sensitivity.

*E. coli* O157:H7 was inoculated into tubes of food media prepared aerobically and anaerobically and given a heat treatment before incubating at 30°C. There was a large difference in heat resistance of cells in the different foods tested.  $D_{59^\circ\text{C}}$  in anaerobically prepared beef was 5.3 minutes, in mushroom, 4.0 minutes, in chicken, 3.7 minutes and in milk only 1.9 minutes. D values in aerobically prepared media were similar to those in anaerobic media. This was because aerobically prepared media had very low redox potentials, similar to those of the anaerobically prepared media. Growth of *E. coli* O157:H7 was not detected in broccoli, carrot or potato media.

# 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, o microrganismo *Escherichia coli* O157:H7 emergiu como potente agente patogênico, tendo sido responsável por vários surtos de origem alimentar envolvendo diversos alimentos, tais como, produtos cárneos, leite, maionese, cidra de maçã e outros (GRIFFIN & TAUXE, 1991). As enfermidades que *E. coli* O157:H7 causa podem ser extremamente severas aos indivíduos afetados, podendo ser fatais em alguns casos. Embora se conheça a severidade das doenças associadas a este microrganismo, e o número crescente de indivíduos infectados pelo mesmo, pouca informação se encontra disponível a respeito das características de sobrevivência e controle de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

*E. coli* O157:H7 é reconhecida como o agente responsável pelo desenvolvimento de casos de colite hemorrágica, um quadro que se manifesta através de dores abdominais intensas e presença de diarreia sanguinolenta. A colite hemorrágica pode desencadear complicações que ameaçam a vida do paciente, sendo a mais comum denominada síndrome urêmica hemolítica, a qual compromete as funções renais do indivíduo (DOYLE, 1991). Esta espécie de bactéria é capaz de produzir toxinas que atuam nas células epiteliais do intestino.

Os surtos devido a infecção por *E. coli* O157:H7 muitas vezes são relacionados ao consumo de carne bovina moída mal cozida ou de leite não pasteurizado (DOYLE, 1994), muito embora este microrganismo também tenha sido isolado de outros animais, como suínos, aves e carneiro (SCHOENI & DOYLE, 1994).

Em muitos alimentos, os patógenos vegetativos são eliminados ou controlados através de tratamentos térmicos brandos. A eficácia de um tratamento térmico é normalmente avaliada pela recuperação das células

injurizadas em condições de aerobiose. Estudos de fisiologia microbiana mostraram que células injurizadas por tratamento térmico são mais eficientemente recuperadas sob condições anaeróbicas estritas, do que pelos métodos de plaqueamento aeróbicos tradicionalmente utilizados (KNABEL et al., 1990). Isto indica, que é muito importante que se conheça aspectos relacionados às condições de recuperação dos microrganismos patogênicos injurizados por tratamento térmico, principalmente em relação a sua sensibilidade ao oxigênio e estresse oxidativo.

A resistência térmica de um microrganismo é influenciada por muitos fatores. Um dos fatores que contribuem para o aumento da resistência térmica bacteriana é a exposição dessas células a temperaturas alguns graus superiores a sua temperatura normal de crescimento. Isso as tornam mais resistentes a um processamento térmico posterior. Uma possível explicação para esse fato é a produção de proteínas do "choque térmico" (MACKEY & DERRICK, 1986). Também já foi sugerido, que o crescimento em condições de anaerobiose por si só, pode ser considerado um fator de estresse para a célula, induzindo a síntese de proteínas do choque térmico (SPECTOR et al., 1986). Esta resposta ao choque térmico tem sido observada em várias espécies de bactérias e também em células eucarióticas.

O uso de embalagens sob atmosfera modificada (em condições de baixas concentrações de oxigênio) em alimentos submetidos a processamento térmico brando, tem se tornado prática comum. Tais alimentos, aparentemente seguros sob o ponto de vista microbiológico, apresentam risco à saúde do consumidor. Através do tratamento térmico brando e da embalagem sob atmosfera modificada, elimina-se a microbiota deterioradora constituída por bactérias aeróbicas, estendendo-se a vida-de-prateleira do produto. Contudo, ao se eliminar as bactérias competidoras e reduzindo-se o potencial de óxido-redução, pode-se promover a recuperação de células de patógenos, aumentando-se o risco de toxinfecção alimentar. A

ocorrência de choque térmico ou de crescimento sob condições de anaerobiose, em microrganismos como *E. coli* O157:H7, pode resultar no aumento da habilidade destes em se recuperar após um tratamento térmico brando. Isto sugere que os métodos tradicionais aeróbios, utilizados para determinar a eficácia de um tratamento térmico, podem apresentar dados subestimados sobre as condições microbiológicas do alimento processado, caso este apresente baixo potencial de óxido-redução, tenha sido embalado sob condições de baixa concentração de oxigênio ou tenha sido aquecido paulatinamente.

O objetivo desse trabalho foi estudar como a recuperação de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas pelo calor é afetada pelo tratamento térmico, pelo choque-térmico antes do tratamento térmico, pela temperatura de incubação após o tratamento térmico, pela atmosfera gasosa e potencial de óxido-redução do meio de recuperação. Considerou-se que o número total de células sobreviventes é determinado sob condições anaeróbias e o número de células injuriadas é determinado sob condições aeróbias. A diferença obtida entre essas duas contagens é o número de células injuriadas que é sensível ao oxigênio.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, verifica-se a tendência da preferência do consumidor por produtos alimentícios semi-prontos ou prontos, submetidos a tratamento térmico brando, com redução do uso de conservadores e que apresentem vida-de-prateleira prolongada. O processamento térmico e o envazamento de produtos sob atmosfera modificada são ferramentas importantes que visam assegurar a durabilidade, o frescor, o aumento da estabilidade e segurança do alimento, garantindo produtos de boa qualidade nos aspectos microbiológicos, nutricionais e organolépticos.

Geralmente, em resposta às preferências do consumidor, novos produtos alimentícios são lançados no mercado antes que se conheçam e se analisem minuciosamente seu potencial para desenvolver problemas de saúde. Isto pode se relacionar ao conceito de "hurdle" ou "teoria dos obstáculos" (LEISTNER & GORRIS, 1995), no qual os "hurdles" devem compor e atuar num determinado alimento, interagindo direta ou sinergisticamente para garantir a segurança microbiológica do alimento. Dentre os "hurdles" presentes num alimento podemos destacar: temperatura, pH, potencial de óxido-redução, atividade de água, microbiota competidora e agentes conservadores. Assim, qualquer redução na intensidade de um "hurdle" que controle a ecologia microbiana de um produto alimentício, deve ser compensada com a intensificação de um outro, garantindo o mesmo grau de segurança ao alimento.

Já se confirmou (GEORGE et al., 1997) que um processo térmico delineado para eliminar microrganismos patogênicos pode ser insuficiente, caso o alimento tenha sido processado em baixas temperaturas e embalado sob atmosferas gasosas em baixas concentrações de oxigênio ou de potencial de óxido-redução. Recentemente, a emergência de *E. coli* O157:H7, um potente microrganismo patogênico, tornou imprescindível a busca por informações que garantam a segurança microbiológica desses alimentos, protegendo a saúde dos consumidores. Este microrganismo foi responsabilizado pela ocorrência de diversos surtos (GRIFFIN & TAUXE, 1991), que causaram doenças graves e, em alguns casos foram letais.

## 2.1. Características gerais de *E. coli* O157:H7

### 2.1.1. Descrição

*Escherichia coli* é constituinte normal da microbiota do trato gastrointestinal do homem e de animais. *E. coli* é bastonete Gram negativo, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos (COWAN, 1974). Taxonomicamente é classificada na família Enterobacteriaceae, que é principalmente composta por vários gêneros de bactérias, geralmente associadas ao trato intestinal. Existem vários tipos de *E. coli*, a maioria dos quais não são patogênicos ao ser humano, podendo até mesmo oferecer benefícios ao seu hospedeiro. Como habitante natural do trato intestinal humano e de animais, muitos desses microrganismos atuam na inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Elas podem também sintetizar vitaminas necessárias ao crescimento dos indivíduos, auxiliando na manutenção de boas condições de saúde (DUNCAN & CAMERON, 1994). Esta espécie de bactéria tem sido a muito tempo utilizada como indicadora da poluição fecal da água e alimentos, sem que o consumo destes microrganismos resulte em danos à saúde do consumidor.

Dos 173 sorogrupos de *E. coli* identificados nos últimos 50 anos (SHINJI & TATSUO, 1996), aproximadamente 60 são reconhecidos como patogênicos, causadores de doenças no homem ou em animais (WINKEL & WENCK, citados por DUNCAN & CAMERON, 1994). Assim, apesar da maioria das linhagens desses microrganismos não ser patogênica, algumas linhagens de *E. coli*, pertencentes ao grupo dos enteropatógenos, podem causar diarreia e outras doenças mais severas (MADDEN, 1994a).

As formas de *E. coli* que são patogênicas ao homem são agrupadas de acordo com suas propriedades de virulência, síndromes clínicas provocadas, diferenças na epidemiologia e sorogrupos O:H distintos (LEVINE, 1987). As subclasses denominam-se: enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAggEC), enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica clássica (EPEC), e enterohemorrágica (EHEC) ou verotoxigênica

(VTEC) (MENG et al., 1994). Vários fatores de virulência estão envolvidos na determinação do potencial de patogenicidade das linhagens de *E. coli*. Muitos desses fatores estão presentes em plasmídeos, podendo então, serem transferidos entre as linhagens ou se perderem em condições de cultivo prolongado (MADDEN, 1994a).

Na última década, as *E. coli* enterohemorrágicas emergiram como agente de extrema importância para a saúde pública, uma vez que a infecção provocada por estas bactérias pode resultar em danos severos ao homem (DOYLE, 1994). Este grupo de bactérias pode ser responsável por uma série de doenças em humanos, desde diarreia branda até colite hemorrágica (uma doença severa envolvendo diarreia sanguinolenta) e síndrome urêmica hemolítica (doença nos rins). Admite-se que a adesão destas bactérias às células do epitélio intestinal e a produção de toxinas, são as responsáveis pelo quadro clínico (GRIFFIN & TAUXE, 1991). As *E. coli* enterohemorrágicas constituem as linhagens de *E. coli* que são capazes de produzir uma ou mais toxinas que são citotóxicas a células Vero (provenientes de culturas celulares de rim de macacos verdes africanos) (DOYLE, 1991). Estas toxinas são conhecidas como verotoxinas ou verocitotoxinas (VT-1 e VT-2) ou toxinas "Shiga-like" (SLTEC), devido a sua similaridade a citotoxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (KARMALI et al., 1985; STROCKBINE et al., 1986).

Dentre as *E. coli* enterohemorrágicas, *E. coli* O157:H7 é a linhagem mais frequentemente associada a doenças humanas, e também a mais estudada em animais utilizados para o consumo humano (DORN, 1995).

As linhagens de *E. coli* podem ser subdivididas com o auxílio de vários métodos, tais como tipagem por bacteriófagos e padrões de sensibilidade a antibióticos, porém, o método mais utilizado é o de tipagem sorológica (MOLENDÁ, 1994). A tipagem sorológica é baseada nas diferenças antigênicas encontradas nas estruturas da superfície bacteriana. As superfícies bacterianas possuem moléculas químicas denominadas antígenos. Os antígenos podem ser proteínas ou carboidratos, que ao entrarem em contato com um animal desencadeiam a produção de anticorpos contra o mesmo. O soro sanguíneo de um animal que possui anticorpos contra um antígeno

específico, é denominado anti-soro. Quando os anticorpos presentes no anti-soro entram em contato com o antígeno contra o qual ele foi produzido, ocorre o desencadeamento de uma série de reações imunológicas. O anti-soro que atua contra os vários antígenos presentes na superfície bacteriana, pode ser utilizado para determinar quais antígenos uma determinada linhagem de *E. coli* possui. Dessa maneira, as linhagens de *E. coli* podem ser classificadas sorologicamente. *E. coli* O157:H7 é designada por seus antígenos "O" e "H" (MOLEND, 1994). Os antígenos "O", também conhecidos por antígenos somáticos, são encontrados na parede celular da bactéria e são de natureza polissacarídica. Atualmente, são reconhecidos 173 antígenos "O" presentes em *E. coli* (SHINJI & TATSUO, 1996). Cada qual designado pela letra "O", seguido por um número, tal como O157. Os antígenos "O" formam a base para a classificação sorológica de *E. coli*, sendo que, cada antígeno "O", constitui um sorogrupo "O" distinto. Os antígenos "H", são também denominados antígenos flagelares, se encontram na superfície do flagelo da bactéria, e são de natureza proteica. Existem 56 antígenos "H" conhecidos, sendo que estes são designados pela letra H, seguido por um número, tal como H7. Cada antígeno "H" constitui um tipo distinto de sorotipo "H". Portanto, *E. coli* O157:H7 possui um antígeno polissacarídico O157 em sua parede celular, e um antígeno H7 em seu flagelo.

### **2.1.2. Perspectiva histórica**

O grupo das bactérias enterohemorrágicas, foi descrito em 1977, no Canadá, por KONOWALCHUK et al., enquanto investigavam o uso de células Vero para detecção de toxinas de *E. coli*. Porém, foi somente em 1982, que se reconheceu a importância da *E. coli*, como produtora de verotoxina. *E. coli* O157:H7 foi isolada pela primeira vez, em 1975, na Califórnia (Estados Unidos), em uma mulher que apresentava diarreia sanguinolenta (RILEY et al., 1983).

Foram isoladas linhagens de *E. coli* O157:H7 em pacientes que apresentavam diarreia sanguinolenta severa em dois surtos nos Estados Unidos, nos Estados do Oregon e Michigan (RILEY et al., 1983) e outro em Ottawa, no Canadá (STEWART et al., 1983). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos,

identificou 47 indivíduos com colite hemorrágica, que apresentavam dores abdominais severas, diarréia sanguinolenta e nenhuma evidência de infecção causada por um patógeno entérico conhecido. A doença foi epidemiologicamente relacionada a ingestão de hambúrgueres, comercializados por uma cadeia de restaurantes tipo "fast food". *E. coli* O157:H7 foi recuperada das fezes de metade dos pacientes, sendo que, este microrganismo não foi isolado em indivíduos saudáveis. *E. coli* O157:H7 foi também isolada de amostras de hambúrgueres provenientes do lote implicado, e em amostras de carne congelada, produzida pelo fornecedor dos restaurantes do Estado do Michigan. Os microrganismos isolados não apresentavam características semelhantes às outras *E. coli* enteropatogênicas, sendo agrupados no grupo das *E. coli* enterohemorrágicas (PADHYE & DOYLE, 1992). Até essa data, pouco se sabia a respeito da patofisiologia, epidemiologia ou seqüelas clínicas, resultantes da infecção por *E. coli* O157:H7 (BOYCE et al., 1995).

De acordo com GRIFFIN & TAUXE (1991), 12 surtos de infecção causados por *E. coli* O157:H7 foram relatados nos Estados Unidos, entre os anos de 1982 a 1990. Neste período, também foram documentados surtos no Canadá e Reino Unido. Dentre os surtos ocorridos nos Estados Unidos, uma média de 56 casos foram registrados, sendo que, dentre esses, 18% das pessoas foram hospitalizadas; 3,6% desenvolveram síndrome urêmica hemolítica ou púrpura trombocitopênica trombótica e 1,9% dos indivíduos atingidos faleceram.

Em 1983, foi relatada a produção de verotoxinas por *E. coli* O157:H7 (JOHNSON et al., 1983). Logo, foi reconhecido que outros sorotipos de *E. coli*, são também produtores de verotoxinas, relacionando-se as *E. coli* verotoxigênicas com os casos de colite hemorrágica relatados em diversos países, fato este que foi acompanhado do isolamento desses microrganismos provenientes de casos esporádicos e de surtos.

MARTIN et al. (1986) relataram a presença de *E. coli* O157:H7 em material fecal de gado leiteiro, proveniente de duas fazendas produtoras de leite dos Estados Unidos. Duas pessoas desenvolveram síndrome urêmica hemolítica, após consumirem leite cru produzido nessas fazendas.

Em 1990, um surto de doença intestinal causado por *E. coli* O157:H7 atingiu 70 pessoas participantes de um evento agrícola, nos Estados Unidos. O alimento implicado como veículo do surto foi rosbife (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT - MMWR, 1992).

Em um surto ocorrido em 1991, nos Estados Unidos, cidra de maçã foi identificada como veículo de infecção por *E. coli* O157:H7 (BESSER et al., 1993). De acordo com as investigações, a cidra foi produzida com maçãs não lavadas, coletadas diretamente do solo. Este produto não foi pasteurizado e não foram adicionados agentes conservadores. Suspeita-se de que as maçãs se contaminaram com material fecal presente no solo, ou por contato com o equipamento de moagem contaminado. Em 1996, uma bebida, contendo suco de maçã não pasteurizado, contaminada por *E. coli* O157:H7, também foi a responsável pela ocorrência de um outro surto alimentar nos Estados Unidos (MMWR, 1996).

Em 1992, um surto causado por *E. coli* O157:H7, associado ao consumo de hambúrgueres mal cozidos, provenientes de uma cadeia nacional de restaurantes, ocorreu em 4 estados americanos: Washington, Idaho, Califórnia e Nevada. Este foi o maior surto de infecção por *E. coli* O157:H7 registrado neste continente (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 1993 a, b).

Veículos de contaminação de origem não bovina também foram identificados. Um surto de *E. coli* O157:H7 no Canadá, foi associado ao consumo de sanduíches frios mantidos sem refrigeração (SALMON et al., 1989). No Reino Unido, batatas, possivelmente contaminadas por material fecal contendo *E. coli* O157:H7, foram responsabilizadas por um surto de infecção (MORGAN et al., 1988). Este surto apresentou uma característica surpreendente, pois atingiu um grupo de manipuladores de alimentos que se tornaram infectados por contato com os vegetais crus, não transmitindo, porém, a infecção aos consumidores.

Em 1996, um surto de *E. coli* O157:H7 no Japão, infectou mais de 9.000 pessoas, causando 10 mortes. A maioria das pessoas envolvidas eram crianças que se infectaram

ao consumirem refeição escolar, suspeita-se que os vegetais estavam contaminados com este microrganismo (GUTIERREZ & NETLEY, 1996). Outros dois surtos já haviam ocorrido no Japão, em escolas infantis. Em 1990, 319 pessoas se infectaram e duas crianças morreram, e, em 1996, 317 crianças se infectaram, resultando em duas mortes. Esses acontecimentos levaram o governo japonês a realizar uma campanha de esclarecimento, sobre os perigos da contaminação por *E. coli* O157:H7 em refeições servidas em escolas. No mesmo ano, ocorreu o maior surto devido a infecção por *E. coli* O157:H7 da Grã-Bretanha, atingindo a Escócia, onde houveram 496 casos e 18 mortes (SMITH, 1997). A infecção foi associada ao consumo de carne e “gravy” (molho a base de carne), provenientes de um açougue.

Também foram relatados surtos causados por *E. coli* O157:H7 em outros países, tais como, México, Austrália, China, Coreia, Índia, Tailândia, Israel, Checoslováquia, Alemanha, França, Bélgica, Suíça, Itália, Espanha, Irlanda, Reino Unido, África do Sul, (GRIFFIN & TAUXE, 1991) e Austrália (PATON et al., 1996).

Embora os dados disponíveis a respeito das pessoas atingidas por *E. coli* O157:H7 sejam limitados e de difícil interpretação, evidências sugerem que os casos de infecção por este microrganismo têm crescido (DOYLE, 1991; TARR et al., 1994; BOYCE et al., 1995). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, não tem registros de surtos de síndrome urêmica hemolítica ocorridos antes de 1982, sugerindo que provavelmente, este microrganismo não foi a causa de surtos dessa doença no passado (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Além disso, métodos mais apropriados de “screening” desta bactéria têm sido mais freqüentemente utilizados pelos laboratórios (TARR, 1994).

### **2.1.3. Toxinas**

Em 1983, O'BRIEN et al. relataram que *E. coli* O157:H7 produzia altos níveis de citotoxinas ativas sobre células Vero. Estudos adicionais (O'BRIEN & HOLMES, 1987), revelaram que a verotoxina de *E. coli* O157:H7 não se distinguia antigenicamente da

“Shiga-like” toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1; e era também antigenicamente idêntica em suas atividades biológicas, como citotoxicidade a células HeLa e Vero, letalidade em camundongo ou coelho, e enterotoxicidade, causando acúmulo de fluídos em teste de alça de íleo ligada de coelho.

Após *E. coli* O157:H7 ter sido reconhecida como o agente responsável por casos de colite hemorrágica, as toxinas “Shiga-like” foram detectadas em sobrenadante e lisados de cultura (KONOWALCHUK et al., 1977; JOHNSON et al., 1983), sendo que estas toxinas eram neutralizadas por anti-soro produzido contra toxina Shiga (O’BRIEN et al., 1983). Posteriormente, foi demonstrado que duas toxinas eram produzidas por *E. coli* O157:H7, a “Shiga-like” toxina 1 (SLT-I) ou verotoxina 1 (VT-1) e a “Shiga-like” toxina 2 (SLT-II) ou verotoxina 2 (VT-2). A “Shiga-like” toxina 1 é neutralizada pela toxina anti-Shiga, sendo similar à toxina Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, enquanto que, a “Shiga-like” toxina 2 é antigenicamente distinta, e não é neutralizada pela antitoxina para toxina Shiga (LIOR, 1994). De acordo com O’BRIEN & HOLMES (1987), as “Shiga-like” toxinas são de natureza proteica (GRIFFIN & TAUXE, 1991) e apresentam duas subunidades, A e B, com pesos moleculares de 31.000 e 5.000-7.000 Da, respectivamente (DOYLE, 1991). A subunidade A, constitui-se na porção ativa e, a subunidade B, é a porção que se liga ao receptor da superfície celular.

Em 1983, foi demonstrado que os genes que controlam a produção de VT-1 e VT-2 são codificados por bacteriófagos (LIOR, 1994), sendo que a seqüência de DNA completa dos genes que codificam VT-1 e VT-2 e os elementos regulatórios já foram clonados (JACKSON et al., 1987; NEWLAND et al., 1987). Esses fagos representam elementos genéticos móveis, o que pode explicar o número crescente de linhagens produtoras da toxina. Encontrou-se porém, linhagens de *E. coli* O157:H7 que apresentaram perda em sua capacidade produtora de verotoxinas (LIOR, 1994).

#### **2.1.4. Mecanismo de infecção**

O mecanismo pelo qual *E. coli* O157:H7 causa doenças não foi totalmente esclarecido (MADDEN, 1994a), contudo, vários fatores têm sido associados com a virulência do microrganismo. O processo de adesão da bactéria a mucosa intestinal (DOYLE, 1991) e a produção de uma ou mais verotoxinas, as quais são produzidas por todos os isolados clínicos (PADHYE & DOYLE, 1992), são fatores de importância na infecção por *E. coli* O157:H7.

A maior parte dos estudos moleculares com *E. coli* O157:H7, referem-se a função das “Shiga-like” toxinas (O'BRIEN & HOLMES, 1987), a proteína intimina (YU & KAPER, 1992; LOUIE et al., 1993) e ao plasmídeo pO157 (TZIPORI et al., 1987; FRATAMICO et al., 1993). As toxinas “Shiga-like” contribuem para os sintomas extra intestinais através da mediação da atividade citotóxica do receptor a células alvo (TESH & O'BRIEN, 1991). A proteína intimina está envolvida na adesão de *E. coli* a enterócitos do intestino grosso (LOUIE et al., 1993). O plasmídeo pO157 encontra-se em quase todos os isolados clínicos de *E. coli* O157, e foi inicialmente detectado em linhagens causadoras de surtos de colite hemorrágica (WELLS et al., 1983).

As propriedades de virulência de *E. coli* O157 são distintas das pertencentes às classes de *E. coli* enteroinvasivas, enteropatogênicas e enterotoxigênicas (LEVINE & EDELMAN, 1984). As *E. coli* enterohemorrágicas não se mostraram invasivas em ensaios realizados *in vitro* (WELLS et al., 1983). Estudos realizados em animais gnotobióticos e em culturas de células, não apresentaram evidências de invasão e multiplicação celular, como verificado em bactérias invasivas, como *Shigella* (TZIPORI et al., 1986; TOTH et al., 1990). Além disso, pacientes com infecção por *E. coli* O157:H7 apresentam pouca ou nenhuma febre (MOLENDÁ, 1994), sugerindo que o microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema circulatório.

A adesão de *E. coli* O157:H7 às células intestinais parece ser um aspecto importante ao potencial de patogenicidade do organismo (DOYLE, 1991). De acordo com um mecanismo de patogenicidade proposto, *E. coli* O157:H7 coloniza as células epiteliais

do intestino elaborando toxina(s), que se liga(m) aos receptores de glicolípídeos das células através da subunidade B da toxina. As células epiteliais, então, internalizam a toxina por meio do fragmento da subunidade A. Esta é reduzida enzimaticamente ao fragmento A1, o qual se liga aos ribossomos 60S, estes, por sua vez, inibem a síntese proteica, resultando na morte celular (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

Estudos referentes a aderência de *E. coli* O157:H7 em diferentes tecidos de linhagens de cultura de células, e sobre a importância das fímbrias na adesão, são variáveis e conflitantes. A maioria das *E. coli* O157:H7 possuem um plasmídeo de 60 MDa (DOYLE, 1991). KARCH et al. (1987) associaram o plasmídeo de 60 MDa, presente em *E. coli* O157:H7, com a expressão de um antígeno da fímbria requerida para a adesão a mucosa intestinal. SHERMAN et al. (1987) verificaram que apenas uma entre cinco linhagens de *E. coli* O157:H7 portadoras do plasmídeo de 60 MDa, apresentava fímbrias, embora todas as linhagens apresentavam adesão a células Henle 407 e HEp-2. Esses autores concluíram que outras estruturas da superfície celular, além das fímbrias, podem mediar a adesão de *E. coli* O157:H7 a células epiteliais.

O receptor para as toxinas VT-1 e VT-2 é uma globotriosil ceramida, constituída por uma galactose, a  $\alpha$ -(1-4)-galactose- $\beta$ -(1-4) glicose ceramida (Gb3) (LINGWOOD et al., 1987; WADELL et al., 1987). A Gb3 é abundante no córtex do rim humano e pode ser detectada em culturas de células endoteliais humanas (PADHYE & DOYLE, 1992). Assim, a identificação da Gb3 como receptor funcional de VT-1 e VT-2, é consistente ao papel etiológico das *E. coli* verotoxigênicas na síndrome urêmica hemolítica, na qual as células do endotélio dos vasos do rim são o principal sítio atingido.

Não se sabe se *E. coli* O157:H7 pode produzir verotoxinas nos alimentos, ou mesmo se a ingestão de verotoxinas pré-formadas em alimentos pode causar doenças nos seres humanos (DOYLE, 1991). Contudo, estudos realizados por KITTELL et al. (1991) revelaram que VT-1 é uma toxina relativamente estável ao calor, uma vez que esta pode permanecer ativa em alimentos que foram submetidos a tratamento térmico brando. A toxina VT-1, submetida ao aquecimento entre 45 e 70°C por até 60 minutos,

permaneceu essencialmente a mesma. O aquecimento a 80°C por 60 minutos, ou a 85°C por 5 minutos, inativou completamente a VT-1.

### **2.1.5. Manifestações clínicas**

Vários estudos (KARMALI et al., 1985; SCOTLAND et al., 1988; BOYCE et al., 1995) têm demonstrado que a infecção por *E. coli* O157:H7 é a responsável pela maioria dos casos de colite hemorrágica e de síndrome urêmica hemolítica. De acordo com levantamento realizado, estima-se que *E. coli* O157:H7 causa mais de 20.000 casos de infecção e, pelo menos, 250 mortes a cada ano nos Estados Unidos (BOYCE et al., 1995)

A colite hemorrágica é uma doença que pode atingir indivíduos de todas as idades, caracterizando-se por ocasionar cólicas abdominais severas e fezes aquosas, que podem progredir para diarréias sanguinolentas, vômitos, com presença ou não de febre (LIOR, 1994). A ausência de febre sugere que o microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema circulatório (PADHYE & DOYLE, 1992). As fezes de pacientes infectados por *E. coli* O157:H7, muitas vezes, apresentam apenas sangue e ausência de material fecal simulando uma hemorragia gastrintestinal, enquanto que, outros pacientes infectados apresentam quadro de diarréia com ausência de sangue (BOYCE et al., 1995). A dor abdominal causada por *E. coli* O157:H7, é descrita como sendo de intensidade semelhante as dores de mulheres em trabalho de parto, sendo considerada mais severa do que apendicite (PADHYE & DOYLE, 1992). A colite hemorrágica pode ser extremamente severa, sendo que, de acordo com um levantamento realizado, 50% dos pacientes positivos para *E. coli* O157:H7 foram hospitalizados (GRIFFIN et al., 1993). Os sintomas dessa doença duram em média 2 a 9 dias (DOYLE, 1991).

A infecção por *E. coli* O157:H7 pode se intensificar e ocasionar a síndrome urêmica hemolítica, que se constitui numa doença ainda mais severa do que a colite hemorrágica. Esta ocorre em aproximadamente 5 a 10% dos pacientes com idade inferior a 10 anos (TARR, 1994). A síndrome urêmica hemolítica é caracterizada principalmente por nefropatia aguda (doença de rim), anemia microangiopática hemorrágica (coagulação

intravascular dos eritrócitos, resultando no dano mecânico destes), e trombocitopenia (baixa circulação de plaquetas) (DOYLE, 1991). Dentre outros sintomas apresentados por esta doença destacam-se, cólicas abdominais agudas, diarreia sanguinolenta e febre de baixa intensidade (DUNCAN & CAMERON, 1994), podendo causar ainda, doenças cardiovasculares (PADHYE & DOYLE, 1992), e do sistema nervoso central, e mesmo levar à morte (DOYLE, 1991). Este quadro pode levar a perda permanente da função renal. A hospitalização é requerida, e a diálise e transfusão sanguínea podem ser necessárias para a recuperação do indivíduo (TARR, 1994).

A púrpura trombocitopênica trombótica é uma doença que atinge o sistema nervoso central, podendo causar coágulos sanguíneos no cérebro, especialmente em idosos (DOYLE, 1991). Esta caracteriza-se por ser uma forma mais grave da síndrome urêmica hemolítica, na qual a febre alta e sintomas neurológicos estão presentes. A púrpura trombocitopênica trombótica acarreta ainda, a redução do número de plaquetas sanguíneas (MOLENDÁ, 1994). Os pacientes podem desenvolver coágulos sanguíneos no cérebro, o que pode levar à morte (PADHYE & DOYLE, 1992).

Os quadros de síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombocitopênica trombótica parecem estar associados com a verotoxina, que causa danos às células endoteliais, em um processo que pode resultar na agregação de trombócitos e causar danos a vasos capilares do rim ou outros órgãos, podendo, em pequena proporção dos casos, ser letal (LIOR, 1994). A taxa de morte por *E. coli* O157:H7 é de três a cinco por cento (TARR et al., 1989; MARTIN et al., 1990).

Os sintomas da infecção causada por *E. coli* O157:H7 não são amplamente reconhecidos pela população ou até mesmo pelos médicos, sendo que muitas vezes, a doença não é detectada (DUNCAN & CAMERON, 1994). Contudo, a doença causada por *E. coli* O157:H7 pode também manifestar-se na forma de diarreia branda podendo, nesses casos, não ser reportada. Embora a infecção assintomática possa ocorrer ocasionalmente, *E. coli* O157:H7 não é um microrganismo normal da microbiota do trato intestinal humano (BOYCE et al., 1995). De acordo com estudo epidemiológico (GRIFFIN et al., 1993), realizado em 10 hospitais nos Estados Unidos, *E. coli* O157:H7 foi isolada

de 0,4% das amostras de fezes de 26.239 pacientes. A dose infectante da *E. coli* O157:H7 não é conhecida, mas suspeita-se que ela seja muito baixa. Em algumas amostras de carne associadas com ocorrências de surtos de *E. coli* O157:H7, o número de bactérias foi estimado em 1000/g (LIOR, 1994). WILLSHAW et al. (1994) isolaram *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres relacionados a surto de infecção no Reino Unido, estimando a presença de menos de 25 células de *E. coli* O157:H7 por grama de amostra de carne, e dose infectante de apenas 10 microrganismos. O período de incubação típico para o aparecimento dos sintomas causados por *E. coli* O157:H7, é de aproximadamente 1 a 4 dias, e a duração dos sintomas é, em geral, de 5 a 10 dias (LIOR, 1994).

#### **2.1.6. Fatores de risco relacionados a doenças causadas por *E. coli* O157:H7**

Vários fatores determinam a natureza das doenças causadas por *E. coli* O157:H7, entre eles a predisposição dos hospedeiros, dose ou características relacionadas a linhagem infectante (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Contudo, existem alguns fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento das manifestações clínicas causadas por *E. coli* O157:H7, incluindo-se: faixa etária, sexo, estado mental, expressão de um antígeno específico por células vermelhas, contagem elevada de leucócitos no início da diarreia, tipo de toxina da linhagem infectante, uso de terapia com agentes antimicrobianos (GRIFFIN & TAUXE, 1991).

As doenças causadas por *E. coli* O157:H7 atingem indivíduos de todas as faixas etárias, porém, as crianças com menos de cinco anos de idade e os idosos, apresentam maior susceptibilidade a elas (BOYCE et al., 1995).

Alguns estudos mostraram que indivíduos do sexo feminino apresentaram maior propensão em desenvolver infecção por *E. coli* O157:H7 (CIMOLAI et al., 1990; ROWE et al., 1991), porém, outros estudos não confirmaram esses resultados (CIMOLAI et al., 1991).

Em um grupo de 20 indivíduos, 8 pessoas com problemas de ordem mental, desenvolveram síndrome urêmica hemolítica devido a infecção por *E. coli* O157:H7, enquanto que, dentre as 30 pessoas mentalmente saudáveis observadas, nenhuma se envolveu neste surto (PAVIA et al., 1990). Isto sugere que pessoas com problemas mentais podem apresentar um fator de risco para o desenvolvimento de infecção por *E. coli* O157:H7.

Os antígenos P1 e PK das células vermelhas do sangue possuem uma seqüência de açúcar requerida para que a toxina “Shiga-like” se ligue a seu receptor (ROSE & CLARK, 1989).

Atualmente, não existe um consenso quanto aos riscos e benefícios do uso da terapia com drogas antimicrobianas para o tratamento das doenças causadas por *E. coli* O157:H7, uma vez que, nenhuma terapia específica se mostrou eficaz em pacientes infectados (BOYCE et al., 1995). De acordo com TARR (1994), os antibióticos podem estimular uma maior liberação de toxinas de *E. coli* O157:H7, provenientes dos microrganismos em estado de injúria ou mortos, fazendo com que mais toxina se torne disponível para a absorção sistêmica.

As características da linhagem infectante podem influenciar no desenvolvimento da síndrome urêmica hemolítica (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Assim, verificou-se que no Reino Unido, 10 (91%) entre 11 linhagens que produziam apenas “Shiga-like” toxina 2 eram provenientes de pacientes com síndrome urêmica hemolítica, comparadas a cinco (50%) entre 10 linhagens que eram produtoras de ambas as toxinas SLT-I e SLT-II, ou apenas de SLT-I (SCOTLAND et al., 1987).

### **2.1.7. Características bioquímicas e de crescimento**

A maioria dos isolados de *E. coli* O157:H7 apresentam características típicas de outras *E. coli* (DOYLE, 1991). Em alguns aspectos porém, *E. coli* O157:H7 se diferencia da maioria das outras *E. coli*. Diferenças quanto às propriedades bioquímicas incluem:

incapacidade de fermentar sorbitol, atividade de  $\beta$ -glucuronidase e produção de enterohemolisina.

Mais de 90% das linhagens de *E. coli*, fermentam sorbitol em 24 horas, porém *E. coli* O157:H7 é sorbitol-negativa neste período de tempo (JOHNSON et al., 1983; WELLS et al., 1983; RATNAN et al., 1988). Da mesma forma, a maioria das *E. coli* (>90%) produz  $\beta$ -glucuronidase, necessária para o teste rápido MUG. O indicador, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronídeo (MUG), é utilizado para detecção de *E. coli* (FENG & HARTMAN, 1982). Este composto é hidrolisado por  $\beta$ -glucuronidase, que é uma enzima presente na maioria das linhagens de *E. coli* para produção de um produto fluorogênico. *E. coli* O157:H7, por sua vez, é  $\beta$ -glucuronidase negativa (DOYLE & SCHOENI, 1984), indicando que a atividade de  $\beta$ -glucuronidase, não é fenotipicamente expressa por este microrganismo. No entanto, foram descritas linhagens de *E. coli* O157:H7 isoladas na Alemanha, que apresentaram a característica de fermentar sorbitol em 24 horas e eram MUG positivas, o que torna mais difícil a identificação desse sorotipo (GUNZER et al., 1992).

BEUTIN et al. (1989) identificaram um tipo de hemolisina, denominada enterohemolisina, que pode ser detectada apenas em placas de sangue contendo eritrócitos. A maior parte das *E. coli* produtoras de verotoxinas produzem esta hemolisina, porém não outras linhagens de *E. coli*.

Outra diferença importante de *E. coli* O157:H7, é quanto a faixa de temperatura de crescimento. Este sorotipo apresenta crescimento pobre entre 44,0 e 45,5°C, temperaturas normalmente utilizadas para detectar *E. coli* em alimentos (DOYLE & SCHOENI, 1984). RAGHUBEER & MATCHES (1990) determinaram que a faixa de temperatura para o crescimento de *E. coli* O157:H7 varia de 24,3 a 41°C em 24 horas, e de 19,3 a 41°C em 36 ou 48 horas, respectivamente. Estudos realizados em caldo tripticase de soja, indicaram que o microrganismo cresce rapidamente entre 30 a 42°C, com tempo de geração variando entre 0,49 horas a 37°C e 0,64 horas a 42°C (DOYLE & SCHOENI, 1984). Dessa forma, a faixa de temperatura para o crescimento de *E. coli* O157:H7 é incompatível com a de outros coliformes fecais, sugerindo que este patógeno

é excluído nos procedimentos padrões de detecção utilizados em alimentos e água (RAGHUBEER & MATCHES, 1990).

### **2.1.8. Procedimentos de detecção e isolamento**

A gravidade das doenças causadas por *E. coli* O157:H7 faz necessária a prevenção do consumo de alimentos contaminados, através de análises microbiológicas dos produtos alimentícios. Por razões já mencionadas, os procedimentos tradicionais para detecção de *E. coli* em alimentos não são úteis para *E. coli* O157:H7. Os métodos microbiológicos utilizados devem ser capazes de detectar rapidamente um pequeno número de células de *E. coli* O157:H7, dentre uma microbiota bacteriana normalmente presente. Pesquisadores têm tentado desenvolver métodos rápidos de detecção de *E. coli* O157:H7 (SCOTLAND et al., 1988; TODD et al., 1988; CHAPMAN, 1989; SERNOWSKI & INGHAM, 1992), uma vez que o método tradicional demora 6 dias para a liberação dos resultados (MERMELSTEIN, 1993).

Técnicas de cultivo direto podem ser adequadas para o isolamento de *E. coli* O157:H7, em amostras de material fecal de pacientes em fase aguda da doença, porém, métodos mais sensíveis são requeridos para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras de alimentos e no ambiente (WALLACE & JONES, 1996). Nesses casos, quando a bactéria pesquisada se encontra presente em baixas concentrações, comparadas com a microbiota contaminante, a etapa de enriquecimento se faz necessária (HINDLE et al., 1995; SANDERSON et al., 1995; ZHAO et al., 1995).

Meios seletivos, baseados na incapacidade de *E. coli* O157:H7 em fermentar sorbitol (MARCH & RATMAN, 1986) ou ramnose (CHAPMAN et al., 1991), e a ausência da enzima  $\beta$ -glucuronidase (THOMPSON et al., 1990; HAMMACK et al., 1994), têm sido características freqüentemente utilizadas para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em uma variedade de amostras. A eficácia de meios de culturas seletivos para a recuperação de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas por tratamentos térmicos e por congelamento, tem sido testada (CONNER & HALL, 1994; CLAVERO & BEUCHAT, 1995).

O "kit" comercial de teste "latex slide" (OXOID DR 620) para identificação de *E. coli* O157:H7, mostrou ser uma alternativa ao método padrão de aglutinação em tubo, que utiliza anti-soro para *E. coli* O157:H7 (DIFCO) (CHAPMAN, 1989). Este teste realizado em lâminas, é baseado na ocorrência de aglutinação entre a suspensão de microrganismo a ser testada e o reagente teste, que consiste em partículas de látex revestidas por anticorpos de coelho.

O uso de frações de membranas microbianas esterilizadas (Oxyrase™), derivadas da membrana plasmática de células rompidas de *E. coli*, atuam na remoção do oxigênio dissolvido do meio, levando a uma melhora da taxa de crescimento de bactérias anaeróbias ou anaeróbias facultativas (HOSKINS & DAVIDSON, 1988). Glicose oxidase, enzima que catalisa a reação entre glicose e oxigênio, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, é um elemento que reage com o oxigênio. Em estudo realizado, a adição de Oxyrase™ ao caldo de pré-enriquecimento universal, melhorou a taxa de crescimento de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, durante as 6 horas iniciais de incubação a 37°C, comparativamente a enzima glicose oxidase e também ao controle (BOHRA et al., 1995).

Uma vez que a produção de toxinas é o principal fator de virulência de *E. coli* O157:H7 (DOYLE, 1991), a detecção de colônias verotoxigênicas pode ser realizada através de técnicas como ensaio "imunoblot" (designado para detecção de colônias produtoras de toxina) (DOYLE & SCHOENI, 1987) ou pela detecção de genes que codificam verotoxinas utilizando-se sondas de DNA para VT-1 e VT-2 (SCOTLAND et al., 1988). Recentemente, foi proposto o isolamento de *E. coli* O157:H7 em alimentos e fezes, utilizando-se a técnica de separação imunomagnética e reação de Polimerase em Cadeia - PCR (WEAGANT et al., 1995). A presença de verotoxinas pode ser demonstrada em ensaios celulares, utilizando-se para isso células Vero, ou HeLa, ou, ainda, através de ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay) (SERNOWSKI & INGHAM, 1992). Ensaio com células Vero, têm se mostrado mais eficientes do que com células HeLa, uma vez que algumas verotoxinas apresentam pouca ou nenhuma atividade sobre células HeLa. Técnicas moleculares, tais como, Análise do Perfil de Plasmídeos, Padrão de Endonucleases de Restrição, Eletroforese de Enzimas Multilocus, "Pulse-Field Gel

Electrophoresis” e PCR com primers arbitrários (RAPD), constituem outras ferramentas que podem ser utilizadas em investigações de surtos alimentares (LIOR, 1994).

DOYLE & SCHOENI (1987) utilizaram um sistema específico para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em alimentos, baseado na associação de uma etapa de enriquecimento em meio seletivo, seguido da filtração da cultura enriquecida em membrana HGMF ISO-GRID (membrana de filtro hidrofóbico), e da detecção de citotoxinas através da técnica “imunoblot”. A confirmação dos isolados de *E. coli* O157:H7 foi realizada através de testes bioquímicos, sorológicos e de citotoxicidade a células Vero. Este método, embora laborioso, mostrou-se eficaz para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em carne crua, com baixos números do microrganismo.

Foi constatada uma limitação dos procedimentos de detecção de *E. coli* O157:H7 que se utilizam de anticorpos policlonais O157 como reagente principal, uma vez que, pode ocorrer resultados falso-positivos. Tipicamente, o anti-soro policlonal O157, apresenta reação cruzada com outras bactérias (SERNOWSKI & INGHAM, 1992). De acordo com DOYLE (1991), já foi produzido um anticorpo monoclonal específico para *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O26:H11, o qual reage especificamente com proteínas da membrana externa destes microrganismos, e não apresenta reação cruzada com antígenos de *E. coli* O157 ou outras bactérias que reagem com os anticorpos policlonais para O157.

### **2.1.9. Transmissão/incidência em alimentos**

A maioria das infecções por *E. coli* O157:H7 é de origem alimentar. Os alimentos derivados de carne bovina foram considerados como o principal veículo na maioria dos surtos, sendo o gado identificado como importante reservatório desse patógeno (MERMELSTEIN, 1993; DOYLE 1994). *E. coli* O157:H7 é encontrada nos intestinos de aproximadamente 1% do gado (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Em geral, esta bactéria não causa doenças nos animais (DORN, 1995), o que dificulta a identificação e a remoção dos animais portadores desse patógeno da cadeia alimentar (MERMELSTEIN, 1993). Os

produtos alimentares podem ser contaminados durante as etapas de abate, ordenha, processamento, armazenamento, preparo ou distribuição. Contaminação cruzada do alimento, pode ocorrer durante o processamento, preparo, venda (ABDUL-RAOUF et al., 1993a) e por contato do mesmo, com superfícies ou equipamentos contaminados (DORN, 1995). Os surtos associados ao consumo de carne moída ou leite ocorrem, em geral, porque a carne não foi devidamente cozida e o leite não foi pasteurizado (DOYLE, 1994).

DOYLE & SCHOENI (1987) pesquisaram a incidência de *E. coli* O157:H7 em carnes frescas do comércio. Este microrganismo foi isolado em 3,7% das amostras de carne bovina; 1,5% das carnes de frango; 1,5% das carnes suínas; e 2% das carnes de carneiro. Foi relatado que *E. coli* O157:H7 coloniza o ceco de frango (SCHOENI & DOYLE, 1994). Não se sabe se o gado é a única fonte de *E. coli* O157:H7, ou se outros alimentos derivados de carne bovina e leite contaminam-se com o microrganismo durante o processamento e manuseio, ou ainda, se os animais produtores de alimento são também portadores de *E. coli* O157:H7. Porém, considerando que o microrganismo já foi isolado de suínos, carneiros e veados, é possível que esses animais sejam portadores de *E. coli* O157:H7 (DOYLE, 1991)

No Brasil, são praticamente inexistentes dados sobre a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em alimentos. No entanto, está sendo realizado um estudo para avaliação da ocorrência desse microrganismo em hambúrgueres de carne bovina provenientes de frigoríficos localizados nas regiões sul e sudeste do país (SILVA, 1997). Até o momento, foram analisadas 888 amostras, das quais 49 (5,5%) apresentaram cepas do sorogrupo O157, essas cepas estão sendo submetidas a testes adicionais para confirmação definitiva da identidade.

Alguns dos produtos considerados fontes de *E. coli* O157:H7, e muitas vezes implicados em surtos são: hambúrguer (RILEY et al., 1983; GRIFFIN & TAUXE, 1991; TARR, 1993; WILLSHAW et al., 1994); leite (MARTIN et al., 1986; CHAPMAN et al., 1993; UPTON & COIA, 1994); cidra de maçã (BESSER et al., 1993; LIOR, 1993); água (GRIFFIN & TAUXE, 1991; RICE, 1993; WANG & DOYLE, 1996); maionese (WEAGANT

---

\* Comunicação pessoal

et al., 1994; RAGHUBEER et al., 1995); carne de frango (CARTER et al., 1987; DOYLE & SCHOENI, 1987; CONNER & HALL, 1996); vegetais (GRIFFIN & TAUXE, 1991; ABDUL-RAOUF et al., 1993b; GUTIERREZ & NETTLEY, 1996); salame (CLAVERO & BEUCHAT, 1996; DUFFY et al., 1996); sanduíche de peru (MARTIN et al., 1986; SALMON et al., 1989); presunto (KNIGHT, 1993).

Outros modos de transmissão de *E. coli* O157:H7 também já foram relatados. A transmissão do microrganismo pessoa-a-pessoa ocorre principalmente através de higiene inadequada (GRIFFIN & TAUXE, 1991; BOYCE et al., 1995). A transmissão pessoa-a-pessoa é uma importante via de transmissão da bactéria, tendo causado surtos familiares e em instituições, como creches e asilos (CARTER et al., 1987; SMITH, 1997). A facilidade com que *E. coli* O157:H7 se transmite de pessoa-a-pessoa sugere, tal qual ocorre com *Shigella*, que a dose infectante desse microrganismo seja baixa (LIOR, 1994; BOYCE et al., 1995). Foram documentados casos de transmissão de *E. coli* O157:H7 por fornecimento de água municipal não clorada (SWERDLOW et al., 1992) e transmissão em pessoas que nadaram em lago contaminado com material fecal (KEENE et al., 1994).

Em estudo realizado em fazendas de gado leiteiro em Wisconsin, Estados Unidos, foi observado que a transmissão horizontal se constitui num modo importante de disseminação de *E. coli* O157:H7 (FAITH et al., 1996). Além disso, os resultados desse estudo sugeriram que a transmissão direta entre animais e o contato com áreas previamente contaminadas por animais portadores de *E. coli* O157:H7, são fatores importantes para a disseminação deste patógeno no rebanho. Outra fonte de contaminação identificada nestas fazendas foi a água disponível aos animais.

TILDEN et al. (1996) avaliaram a produção de salame associado a surtos de infecção por *E. coli* O157:H7, ocorridos na Califórnia e Washington, Estados Unidos (CDC, 1995). Concluiu-se que este produto serve de veículo de transmissão de *E. coli* O157:H7, não havendo evidências de que contaminação pós-processamento tenha ocorrido, cálculos indicam que a dose infectante era menor que 50 células de *E. coli* O157:H7. Dessa forma, embora o salame seja um produto tradicional, preservado por processos de fermentação e secagem, combinados aos efeitos inibitórios de sais,

agentes de cura, condimentos, oferecendo assim, um ambiente hostil a maioria das bactérias patogênicas, este permite o desenvolvimento de *E. coli* O157:H7.

#### **2.1.10. Medidas de prevenção e controle de infecções por *E. coli* O157:H7**

Para fins de se eliminar *E. coli* O157:H7 dos alimentos, os fornecedores de matéria-prima, processadores de alimentos e os estabelecimentos de comercialização de alimentos devem adotar um rígido programa de monitoramento. Dentre outras, faz-se relevante a adoção pela indústria de alimentos do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), para prevenção de contaminação de alimentos por *E. coli* O157:H7, minimizando sua sobrevivência em alimentos (MADDEN, 1994b). A adoção de boas práticas de manufatura em processamento de alimentos de origem animal, e o cozimento apropriado de tais alimentos antes do consumo, constituem importantes medidas de prevenção de infecções por *E. coli* O157:H7 (DOYLE, 1994). A prevenção de contaminação cruzada, entre produtos prontos para o consumo com matéria-prima crua ou equipamentos não sanitizados, além da higiene pessoal, constituem elementos críticos no controle da contaminação de produtos alimentícios com microrganismos patogênicos e deterioradores (RAGHUBEER et al., 1995). Além disso, a refrigeração adequada dos alimentos, evitando-se tempo prolongado e temperaturas abusivas, deve ser observada em todos os ambientes e situações (LIOR, 1994). A prática de se adubar hortaliças com esterco bovino deve ser banida, uma vez que alguns animais podem ser portadores de *E. coli* O157:H7, o que pode resultar na contaminação dos vegetais (ABDUL-RAOUF et al., 1993b; DORN, 1995).

Os alimentos crus de origem bovina, são veículos de *E. coli* O157:H7 através da contaminação fecal durante os procedimentos de abate ou aleitamento (DOYLE, 1994). Durante o abate, existe uma ampla oportunidade para que as bactérias presentes no couro ou no intestino do animal sejam transferidas para a superfície da carne (MACKEY & GIBSON, 1997). Dessa forma, é importante que se introduzam medidas para a melhoria dos padrões higiênicos de abatedores. A separação de áreas denominadas "limpas" das "sujas", limpeza adequada de equipamentos, e a utilização de materiais

apropriados (fáceis de limpar, sem ranhuras ou rugosidades) para o revestimento de paredes, chãos e superfícies, são medidas preventivas importantes a serem adotadas. Outro aspecto importante a ser considerado, é a habilidade da pessoa encarregada do abate dos animais em produzir carcaças com boa qualidade higiênica. O uso de agentes descontaminantes de carcaças, como água quente, ácidos orgânicos, cloro, infravermelho, nisina, fosfato trissódico, não se mostraram eficazes contra *E. coli* O157:H7 (MACKEY & GIBSON, 1997). Os métodos atuais de inspeção de carcaças bovinas são de natureza organoléptica (DUNCAN & CAMERON, 1994), os inspetores examinam as carcaças apenas através da avaliação da aparência, toque e cheiro (MERMELSTEIN, 1993). Uma vez que, em geral, a contaminação microbiológica não é visível, a identificação da contaminação por *E. coli* O157:H7 não é possível através desses procedimentos usuais.

Carne moída mal cozida foi o veículo da maioria dos surtos devido a *E. coli* O157:H7 (GRIFFIN & TAUXE, 1991; WILLSHAW et al., 1994). Os cortes de carne (filés), em geral, podem apresentar contaminação por *E. coli* O157:H7 apenas na superfície, sendo o completo cozimento suficiente para eliminar esta bactéria. Assim, em filés, a temperatura interna de cozimento não é crítica (MERMELSTEIN, 1993). Contudo, na produção de carne moída, *E. coli* O157:H7 é transferida da superfície para o interior do alimento. Se a carne for cozida incompletamente, a bactéria pode sobreviver e ser ingerida. Uma vez que a carne moída pode ser obtida da carne proveniente de muitas carcaças, um pequeno número de animais infectados pode ser suficiente para contaminar o produto (BOYCE et al., 1995). O FDA (Food and Drugs Administration) dos Estados Unidos, recomenda o cozimento desse produto a temperatura interna mínima de 68,3°C (155°F) (MERMELSTEIN, 1993; JACKSON et al., 1995). A esta temperatura de cozimento, os hambúrgueres não devem apresentar coloração rósea no centro e o suco exsudado deve ser claro (MOLENDÁ, 1994).

## **2.1.11. Características de sobrevivência de *E. coli* O157:H7**

### **2.1.11.1. pH e acidulantes**

*E. coli* O157:H7 apresenta alta tolerância a ácidos ( $\text{pH} \leq 4$ ), sendo que esta característica pode desempenhar um papel importante no processo de patogênese, promovendo a sobrevivência deste microrganismo durante sua passagem pelo estômago (ARNOLD & KASPAR, 1995; BENJAMIM & DATTA, 1995). De acordo com estudos realizados por BENJAMIN & DATTA (1995), muitas linhagens de *E. coli* enterohemorrágicas, incluindo-se *E. coli* O157:H7, podem sobreviver em pH 2,5 a 37°C por períodos de até 5 horas, similar ao ambiente gástrico do homem.

Foram realizados estudos para determinar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em valores de pH extremos, utilizando-se caldo tripticase de soja ajustado para pHs 2, 3, 4, 11, 12. Os números de *E. coli* O157:H7 permaneceram constantes após 24 horas de incubação em pHs 3, 4 e 11, apresentando apenas pequena diminuição em pH 2, porém não foram detectadas células viáveis nesse mesmo período de tempo em pH 12 (MILLER & KASPAR, 1994). CONNER & KOTROLA (1995), observaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em  $\text{pH} \geq 4,0$  durante 56 dias, e verificaram que o tipo de acidulante utilizado e a temperatura influenciam na sua sobrevivência.

*E. coli* O157:H7 foi isolada em diversos alimentos ácidos, tais como, cidra de maçã (BESSER et al., 1993), maionese (WEAGANT et al., 1994; RAGHUBEER et al., 1995); produtos lácteos fermentados (AROCHA et al., 1992; MORGAN et al., 1993); salame (DUFFY et al., 1996). De acordo com THIPPAREDDI et al. (1996), células de *E. coli* O157:H7 têm a capacidade de adquirir resistência a ambientes ácidos, o que resulta numa maior tolerância a exposição a condições de acidez mais severas.

*E. coli* O157:H7 pode sobreviver em cidra de maçã, a qual apresenta pH 3,7 (ZHAO et al., 1993). Isto foi reconhecido em 1991, após surto ocorrido nos Estados Unidos, quando maçãs não lavadas que caíram sobre a pastagem, foram utilizadas para produção de cidra de maçã não pasteurizada (BESSER et al., 1993). Em estudo

realizado por ZHAO et al. (1993), cidra de maçã não pasteurizada, com pH entre 3,6 e 4,0 foi inoculada com *E. coli* O157:H7. O microrganismo sobreviveu por 31 dias em temperatura de 8°C. Assim sendo, se este produto fosse consumido durante a vida-de-prateleira estabelecida de duas a três semanas, o patógeno poderia ainda ser viável. Ácidos benzóico e sórbico, comumente utilizados para aumentar a vida-útil de produtos armazenados a temperaturas de refrigeração, reduziram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 quando acrescentados ao suco de maçã (SPLITTSTOESSER et al., 1995).

De acordo com estudo realizado por ABDUL-RAOUF et al. (1993a), *E. coli* O157:H7 mostrou-se capaz de se desenvolver em produtos de carne acidificados e em saladas contendo maionese. Dentre os ácidos utilizados em produtos cárneos, o ácido acético apresentou maior eficácia na inibição do crescimento e inativação de *E. coli* O157:H7, comparativamente aos ácidos láctico e cítrico.

*E. coli* O157:H7 foi capaz de sobreviver durante o processo de fabricação do queijo tipo "Cottage", demonstrando que o pH e acidez realmente não são suficientes para deter a proliferação desse patógeno (AROCHA et al., 1992).

A eficiência de ácidos orgânicos no controle de *E. coli* O157:H7 em carcaças bovinas, foi determinada através da aspersão de ácidos acético, láctico e cítrico. Resultados mostraram, que embora esses tratamentos reduzam as populações de *E. coli* O157:H7, estes não inativam completamente o microrganismo em carne vermelha (CUTTER & SIRAGUSA, 1994).

#### **2.1.11.2. Atividade de água e sais**

GLASS et al. (1992) observaram que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em salsichas fermentadas após processo de fermentação, secagem e armazenamento. Um surto causado por *E. coli* O157:H7 devido ao consumo de salame (CDC, 1995), mostrou que o microrganismo pode sobreviver em alimentos preservados por fermentação (pH ácido), secagem (diminuição de atividade de água), combinados aos efeitos inibitórios de

sais, agentes de cura, e outros condimentos presentes. CLAVERO & BEUCHAT (1996) recuperaram células viáveis de *E. coli* O157:H7 em salames, os quais apresentavam atividade de água de 0,90 e foram armazenados a 5 ou 20°C, por um período de 16 ou 4 dias, respectivamente.

ZHAO et al. (1993) verificaram que benzoato de sódio a 0,1%, freqüentemente utilizado como agente conservador de cidra de maçã, apresentou ação antimicrobiana eficaz sobre *E. coli* O157:H7. Porém, sorbato de potássio a 0,1% não preveniu o crescimento deste microrganismo neste produto. A combinação dos dois conservadores nestas concentrações e na proporção de 1:1, por sua vez, foi muito eficaz. MILLER & KASPAR (1994), utilizando sorbato de potássio em cidra de maçã, também não verificaram efeito inibitório deste, uma vez que, *E. coli* O157:H7 sobreviveu durante 21 dias na presença deste agente conservador.

CONNER & HALL (1996) estudaram o efeito de aditivos alimentares (cloreto de sódio, lactato de sódio e polifosfato) e da temperatura (37, 10, 4, e -20°C), na sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em carne de frango. Constataram que, a 37 e 10°C, cloreto de sódio e lactato de sódio reduziram o crescimento de *E. coli* O157:H7, enquanto que, o polifosfato não apresentou o mesmo efeito. A 4°C, a população de *E. coli* O157:H7 declinou com os tratamentos com polifosfato e cloreto de sódio, mas surpreendentemente, esta apresentou crescimento após 5 semanas na presença de lactato de sódio. A -20°C, após 18 meses, foi constatada a presença de  $>10^4$  UFC/g em carne de frango contendo cloreto de sódio.

### **2.1.11.3. Baixas temperaturas**

*E. coli* O157:H7 é resistente ao congelamento (MERMELSTEIN, 1993). Este microrganismo apresentou pequena variação em hambúrguer inoculado com  $10^4$  UFC/g, após 9 meses de estocagem a -20°C (DOYLE & SCHOENI, 1984). Experimentos realizados com carne de frango inoculada com  $10^6$  UFC/g de *E. coli* O157:H7 e

armazenada a -20°C, mostraram que após 18 meses a população decresceu apenas uma unidade logarítmica (CONNER & HALL, 1996).

LECHOWICH (1988) e CONNER & HALL (1996) sugeriram que *E. coli* O157:H7 é um microrganismo psicrotrófico, capaz de crescer em temperatura de 4°C. Entretanto, DOYLE & SCHOENI (1984) verificaram que a bactéria não cresce nas seguintes temperaturas: 4, 10 e 45,5°C. A incapacidade de *E. coli* O157:H7 se multiplicar a 5°C, foi confirmada por HAO & BRACKETT (1993), contudo as populações se mantiveram viáveis durante os 15 dias de observação, sugerindo sua sobrevivência nessas condições. De acordo com CLAVERO & BEUCHAT (1996), independentemente do pH e atividade de água, *E. coli* O157:H7 apresentou melhor sobrevivência em caldo tripticase de soja a 5°C do que a 20 ou 30°C. RAGHUBEER et al. (1995) observaram que *E. coli* O157:H7 sobreviveu por mais tempo em molho de salada mantido a 4°C do que a 22°C.

ABDUL-RAOUF et al. (1993b) mostraram a diminuição nos níveis populacionais de *E. coli* O157:H7 em vegetais armazenados a 5°C. Entre 12 e 21°C houve um aumento nos níveis de *E. coli* O157:H7. Contudo, em outro estudo (ABDUL-RAOUF et al., 1993a), estes pesquisadores relataram que *E. coli* O157:H7 não é eliminada em salada de carne contendo maionese, armazenada a 5°C por até 72 horas.

#### **2.1.11.4. Irradiação**

THAYER & BOYD (1993) relataram a eliminação de 90% de células viáveis de *E. coli* O157:H7, em carne de frango irradiada por doses de 0,27 kGy a 5°C e 0,42 kGy a -5°C, concluindo que a irradiação é um método eficaz para o controle desse patógeno.

#### **2.1.11.5. Tratamento térmico**

Embora *E. coli* O157:H7 tenha sido responsabilizada por vários surtos associados ao consumo de diversos alimentos (GRIFFIN & TAUXE, 1991), essa bactéria não

apresenta uma resistência térmica incomum (DOYLE, 1994). Surtos relacionados com o consumo de carne moída ou leite, em geral, ocorrem porque a carne foi mal cozida ou o leite não foi pasteurizado (DOYLE, 1994).

A resistência térmica de uma bactéria é definida por dois parâmetros: o valor D, ou seja, o tempo requerido em dada temperatura para destruir 90% de esporos ou células vegetativas de um dado microrganismo; e o valor z, que é o aumento de temperatura necessário para reduzir em 90% seu valor D (STUMBO, 1965).

Muitos fatores contribuem para a resistência térmica de microrganismos em alimentos, destacando-se: composição do alimento e a condição fisiológica das células vegetativas ou esporos (JAY, 1986). Dentre as características dos alimentos que contribuem para o aumento da resistência térmica dos microrganismos, incluem-se: atividade de água, presença de carboidratos, lipídeos, proteínas e sais. As células em fase estacionária de crescimento apresentam uma tolerância térmica maior que as células em fase logarítmica (LINTON et al., 1990). SEMANCHECK & GOLDEN (1996) verificaram uma variabilidade considerável na resistência térmica de *E. coli* O157:H7 entre três linhagens diferentes testadas.

De acordo com DOYLE & SCHOENI (1984), *E. coli* O157:H7 não sobrevive a temperaturas de pasteurização. Seus experimentos mostraram que em carne moída, *E. coli* O157:H7 (valor  $D_{62,8}$  de 0,40 minutos) é mais sensível ao calor do que *Salmonella* (valor  $D_{62,8}$  variando entre 0,60 a 0,70 minutos). Nesse trabalho, foram apresentados valores D para *E. coli* O157:H7 em carne moída às temperaturas de 54,4; 57,2; 58,9; 60; 62,8 e 64,3°C, respectivamente de 39,8; 4,5; 1,2; 0,7; 0,4; e 0,2 minutos. LINE et al. (1991) determinaram a resistência térmica de *E. coli* O157:H7 para carne bovina moída com alto teor de gordura (30,5%) e magra (2,0%). O valor D para carne moída gorda excedeu o da magra nas temperaturas testadas. Os valores D para carne magra e gorda, foram, respectivamente: 78,2 e 115,5 minutos a 51,7°C; 4,1 e 5,3 minutos a 57,2°C e 0,3 e 0,5 minutos a 62,8°C. Os valores z determinados para carne magra e gorda foram de 4,6°C e 4,7°C, respectivamente.

De acordo com JACKSON et al. (1995), as temperaturas de armazenamento e manutenção dos alimentos podem influenciar a resistência térmica de *E. coli* O157:H7. Assim, carne moída foi inoculada com *E. coli* O157:H7, e as porções armazenadas a 3 ou 15°C por 9 horas ou a -18°C por 18 dias e, então mantidas a 21 ou 30°C por 0 ou 4 horas. Os hambúrgueres produzidos foram cozidos para obter temperaturas internas de 54,4; 62,8; e 68,3°C. Observou-se uma maior sobrevivência dos bacilos em hambúrgueres congelados, enquanto que, as culturas presentes no produto mantido a 15°C foram as mais sensíveis ao calor. A manutenção do produto a 21 ou 30°C antes do cozimento, resultou num aumento de sensibilidade deste microrganismo.

SPLITTSTOESSER et al. (1995) estudaram o efeito da composição do suco de maçã na resistência térmica de *E. coli* O157:H7. Os valores D obtidos às temperaturas de 52, 55 e 58°C, foram de 12, 5 e 1 minuto, respectivamente, e o valor z de 4,8°C. O aumento do Brix de 11,8 para 16,5° não afetou a resistência térmica do microrganismo, enquanto que, o aumento do teor de ácido L-málico de 0,2 para 0,8%, ou a redução do pH de 4,4 para 3,6 tornaram as células mais sensíveis ao calor. Porém, o maior efeito na resistência térmica foi obtido pela adição de ácidos benzóico e sórbico: valores D<sub>50</sub>, em suco contendo 1000 mg/l de ácido sórbico foi de 5,20 minutos, e apenas de 0,64 minutos na presença de ácido benzóico.

CHEVILLE et al. (1996) estudaram o efeito de proteínas reguladoras do gene *rpoS* na resistência térmica de *E. coli* O157:H7. Esses autores verificaram que na ausência dessas proteínas, a sensibilidade ao calor dessa bactéria é aumentada significativamente.

## **2.2. Injúria bacteriana**

A injúria microbiana é expressa pela inabilidade destas células em produzir crescimento detectável sob condições apropriadas para a proliferação de microrganismos não injuriados (RAY, 1993). Os microrganismos injuriados se distinguem dos mortos, ou dos que sofreram mutações, por sua habilidade em readquirir atividade fisiológica normal

quando se encontram em condições favoráveis. O retorno para as funções fisiológicas normais é denominado reparo ou recuperação (BUSTA, 1978). A extensão e severidade da injúria subletal, os mecanismos de dano, e os mecanismos e graus de recuperação, variam com os processos térmicos, as espécies e linhagens, condições fisiológicas do microrganismo e métodos de recuperação celular (RAY, 1989).

Células injuriadas são de importância, uma vez que estas células podem não ser detectadas em alimentos através dos métodos de recuperação convencionais, podendo porém, se recuperarem e multiplicarem em alimentos (LINTON et al., 1992). De acordo com McCLEERY & ROWE (1995), as células microbianas injuriadas retêm suas características de patogenicidade.

A injúria pode ser manifestada devido a perda da integridade da membrana celular, aumento da sensibilidade a cloreto de sódio ou sais biliares e/ou degradação do rRNA (TOMLINS et al., 1972).

Várias inferências podem ser úteis para delinear métodos para inibir ou prevenir o crescimento de células indesejáveis e para proteger as células desejáveis (RAY, 1993).

- O estresse subletal injuria células microbianas em vários de seus componentes funcionais.
- As células diferem em relação ao nível de injúria desses componentes, e os efeitos cumulativos determinam se a célula se tornará letalmente injuriada, não letalmente injuriada ou não injuriada.
- As injúrias em alguns componentes são reversíveis através da síntese "de novo" ou reorganização dos componentes.
- As células subletalmente injuriadas não se multiplicam, a não ser que a injúria seja reparada.
- Células subletalmente injuriadas podem ser eliminadas por muitos agentes químicos, para os quais as células normais são resistentes.
- Se o fator de estresse não for removido, as células subletalmente injuriadas são eliminadas e as células não injuriadas se tornam subletalmente injuriadas.

A injúria é resultado da ação de agentes físicos ou químicos fornecidos em doses subletais, que provocam injúrias reversíveis em células microbianas (RAY, 1989). Dentre os principais fatores físicos que causam a injúria bacteriana, destacam-se: baixa temperatura (refrigeração, congelamento); calor (temperatura e tempo inferiores ao tratamento letal); secagem (por ar, liofilização); sólidos (açúcares, sais); radiação (raios X e UV). Os fatores químicos que podem causar injúria bacteriana são: ácidos (orgânicos e inorgânicos); sanitizantes (quaternário de amônia, cloro); conservadores (sorbato, benzoato); químicos tóxicos (cloreto de mercúrio).

As células microbianas injuriadas, embora sejam parte constituinte da população microbiana de células viáveis, apresentam muitas características fisiológicas alteradas. Este fato faz necessário a utilização de um método específico para a avaliação microbiológica, de acordo com o qual, a fração de células injuriadas pode ser detectável ou não. Observou-se que algumas espécies de microrganismos desenvolvem sensibilidade a muitos agentes químicos presentes em meios seletivos, aos quais as células não injuriadas são resistentes. Assume-se que células injuriadas podem se multiplicar rapidamente em meios não seletivos, pois estes meios são capazes de enumerar todos os sobreviventes, enquanto que, meios seletivos irão enumerar apenas as células normais (RAY, 1989). Contudo, estudos posteriores mostraram que meios complexos não facilitam o crescimento de todos os sobreviventes, uma vez que não fornecem os nutrientes necessários. A suplementação do meio seletivo com compostos específicos resultou no aumento da recuperação de células injuriadas (AHMED & CONNER, 1995; McCLEERY & ROWE, 1995; CZECHOWICZ et al., 1996). O uso de agentes seletivos durante a enumeração de microrganismos injuriados, pode aumentar a letalidade destes através do aumento do estresse oxidativo ao qual as células injuriadas são submetidas sob condições de incubação aeróbia (KNABEL et al., 1990).

### **2.2.1. Fatores que interagem com células bacterianas injuriadas por tratamento térmico**

Os efeitos biológicos do calor têm sido pesquisados sob diversos pontos-de-vista, como o da biologia molecular, e também em relação aos usos práticos dos tratamentos térmicos, como esterilização de alimentos, de produtos farmacêuticos e na medicina. Contudo, os mecanismos de morte térmica e injúria das células microbianas, não foram ainda esclarecidos (MIYAKE et al., 1993).

Sabe-se que fatores intrínsecos e extrínsecos associados com a bactéria e ao ambiente no qual esta será submetida ao tratamento térmico, afetam sua resposta ao calor. Os métodos de recuperação microbiana utilizados nos estudos de resistência térmica, podem influenciar, resultando em dados de letalidade (LINE et al., 1991; KNABEL & THIELEN, 1995). Numa situação ideal, as técnicas de recuperação microbiana deveriam permitir a enumeração de todas as células viáveis, inclusive das células subletalmente injuriadas (AHMED & CONNER, 1995).

O aquecimento subletal causa danos aos componentes das células microbianas a nível molecular (HURST, 1977). Os danos celulares mais relatados são: aumento da hidrofobicidade da superfície celular, perda de componentes da membrana citoplasmática, inativação de enzimas celulares, degradação do rRNA e quebras nas fitas de DNA levando a mutações (CZECHOWICZ et al., 1996). Subseqüentemente, ocorre uma perda substancial na viabilidade celular. Uma vez que o metabolismo é prejudicado, as bactérias injuriadas pelo calor podem expressar requerimentos fisiológicos e nutricionais diferentes.

Nos últimos anos, tem se verificado um aumento na produção de alimentos processados por tratamento térmico e embalados à vácuo (LECHOWICH, 1988; CHURCH & PARSONS, 1993). A demanda por tal tipo de alimento, atende às preferências do consumidor por alimentos frescos, submetidos a processamento térmico brando e com vida-de-prateleira prolongada (FARBER, 1991). Do ponto de vista da segurança microbiológica de tais produtos, alguns riscos devem ser considerados.

Patógenos de origem alimentar, tais como, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* (SHAMSUZZAMAN et al., 1992), podem ocasionar problemas se o produto tiver sido subprocessado, neste caso, o desenvolvimento de microrganismos patogênicos pode ser estimulado pela embalagem à vácuo.

## **2.2.2. Fatores que influenciam na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 termicamente injuriadas**

### **2.2.2.1. Atmosfera gasosa**

Em muitos alimentos, os patógenos são eliminados ou controlados através de tratamentos térmicos brandos. A resistência térmica de um microrganismo é influenciada por muitos fatores, tais como, as condições ambientais em que as células são submetidas antes do tratamento térmico, além das condições ambientais oferecidas às células injuriadas termicamente durante a enumeração dos sobreviventes (GADZELLA & INGHAM, 1994).

Em geral, a eficácia de um tratamento térmico é avaliada através da recuperação em condições de aerobiose das células injuriadas pelo calor. Entretanto, alguns trabalhos mostraram um aumento substancial na recuperação sob condições estritamente anaeróbias, de células termicamente injuriadas *Listeria monocytogenes* (KNABEL et al., 1990; LINTON et al., 1990, 1992), *Salmonella enteritidis* (XAVIER & INGHAM, 1993), *Staphylococcus aureus* (UGBOROGHO & INGHAM, 1994), *Escherichia coli* (GADZELLA & INGHAM, 1994) e *E. coli* O157:H7 (MURANO & PIERSON, 1993), comparativamente às condições aeróbias. Estes trabalhos utilizam-se de diversos métodos para a produção das condições anaeróbias, tais como, sobrecamada, uso de jarros de anaerobiose, meios preparados através de técnicas de Hungate estritamente anaeróbias com a adição de indicadores de potencial de óxido-redução. Recentemente, foi confirmado que a resistência térmica de *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* e *E. coli* O157:H7 apresenta um aumento significativo quando células submetidas ao tratamento térmico são recuperadas sob condições de anaerobiose (GEORGE et al., 1997), sendo que, o efeito da

recuperação anaeróbia é maior quanto menor for a temperatura do tratamento térmico. De acordo com KNABEL et al. (1990), o desenvolvimento de ambientes anaeróbios nos alimentos após o processamento térmico, pode permitir o crescimento de células de *L. monocytogenes* injuriadas termicamente. Tais condições devem estar presentes em carnes cozidas e outros alimentos pasteurizados e embalados sob baixas concentrações de oxigênio.

A incubação de células de *E. coli* termicamente injuriadas em jarros de anaerobiose, levou a obtenção de valores D mais elevados do que os obtidos pela incubação aeróbia, enquanto que, o uso de sobrecamada de meio tioglicolato fluído, levou a uma diminuição dos valores D nas temperaturas testadas (GADZELLA & INGHAM, 1994). Esse último resultado contrasta com o obtido por XAVIER & INGHAM (1993), que obtiveram um aumento no valor D em *Salmonella enteritidis* enumerada com o método de sobrecamada de meio tioglicolato fluído. Contudo, resultados similares foram obtidos por UGBOROGHO & INGHAM (1994), que verificaram que esse método não melhorou a recuperação de células de *Staphylococcus aureus* injuriadas termicamente.

#### **2.2.2.2. Embalagens sob atmosfera modificada**

Em geral, define-se alimento embalado sob atmosfera modificada, como sendo aquele estocado sob uma composição de gases diferente a do ar atmosférico. Esta tecnologia pode incluir embalagens à vácuo; sob atmosfera controlada; com fluxo de gás; e filmes permeáveis especiais (FARBER, 1991). Nas embalagens à vácuo, o ar atmosférico é removido de dentro da embalagem sem a substituição por um outro gás. No sistema de embalagem sob atmosfera controlada, o produto é continuamente exposto a uma constante mistura gasosa, enquanto que, no fluxo de gás, a mistura gasosa é injetada apenas uma vez durante a etapa de embalagem. A proporção de cada gás utilizado é fixa ao se introduzir a mistura gasosa na embalagem.

Os gases normalmente usados para embalagem sob atmosfera modificada, incluem o oxigênio ( $O_2$ ), o nitrogênio ( $N_2$ ), e o dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Contudo, outros gases como o monóxido de carbono, etileno, propileno, acetileno, são algumas vezes incluídos (BRECHT, 1980). O  $CO_2$  e  $N_2$ , sozinhos, ou em combinação, são freqüentemente utilizados. O  $O_2$  é usado comercialmente em baixas concentrações, em combinação com os outros gases. De acordo com FARBER (1991), as características desses gases são:

- $O_2$ : Estimula o crescimento de bactérias aeróbias, podendo inibir o crescimento de bactérias estritamente anaeróbias. No caso de carnes embaladas sob atmosfera modificada, a função do  $O_2$  é de manter a mioglobina em sua forma oxidada, a qual é responsável pela coloração vermelha, que confere o aspecto de carne fresca ao produto.
- $N_2$ : É um gás inerte sem sabor, que apresenta pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana por si só. Devido sua baixa solubilidade em água, a presença de  $N_2$  em alimentos embalados sob atmosfera modificada, previne o colapso da embalagem, o qual pode ocorrer quando altas concentrações de  $CO_2$  são usadas. Além disso, ao substituir o  $O_2$  na embalagem, o  $N_2$  pode retardar a rancidez oxidativa e também inibir o crescimento de microrganismos aeróbios.
- $CO_2$ : É solúvel tanto em água como em lipídeo, e é o gás responsável pelo efeito bacteriostático em microrganismos presentes em alimentos embalados sob atmosfera modificada. Para a obtenção de um efeito antimicrobiano máximo, a temperatura de armazenamento de um produto embalado sob atmosfera modificada deve ser a mais baixa possível, uma vez que, a solubilidade do  $CO_2$  diminui com o aumento da temperatura.

Embora muita informação em relação aos aspectos gerais da tecnologia de embalagens sob atmosfera modificada estejam disponíveis, a segurança microbiológica desses produtos deve ainda ser melhor avaliada. Um aspecto negativo, sob o ponto de vista de segurança, é que, em geral, embalagens contendo níveis moderados ou altos de

dióxido de carbono inibem eficazmente os microrganismos deterioradores, enquanto permitem, ou até mesmo, estimulam, o desenvolvimento de patogênicos ou a produção de toxinas (FARBER et al., 1990). Assim, se o uso de embalagens sob atmosfera modificada não for realmente eficaz para evitar a sobrevivência de microrganismos patogênicos após o processamento térmico, esta prática pode resultar em sérios danos a saúde dos consumidores. De acordo com FARBER et al. (1990), existem dois tipos de produtos embalados sob atmosfera modificada, os crus que requerem cozimento completo e os alimentos de baixa acidez, submetidos a um cozimento brando ou que dispensam o cozimento para o consumo, sendo o último grupo o que apresenta maiores riscos sob o ponto de vista microbiológico.

Testou-se o crescimento de *L. monocytogenes* e de *Pseudomonas* em sanduíches de peru, embalados sob diferentes misturas gasosas (FARBER & DALEY, 1994). Constatou-se, que as misturas gasosas testadas proporcionaram uma diminuição do crescimento do microrganismo patogênico *L. monocytogenes*, quando comparadas ao ar, enquanto que, o microrganismo deteriorador, *Pseudomonas*, foi inibido com mais facilidade. O potencial de *Clostridium perfringens* de crescer em carne cozida moída de peru, embalada sob condições aeróbias e anaeróbias (vácuo), foi testado. A 28°C, *Cl. perfringens* apresentou crescimento exponencial na faixa de 7 e 9 ciclos log em 24 horas, em condições anaeróbias e aeróbias, respectivamente. A 15°C, constatou-se um crescimento de 0,3 a 1,5 ciclos log em condições aeróbias e de 4 a 4,5 ciclos log em condições anaeróbias. Células de *Cl. perfringens* mantidas a 4°C tiveram uma diminuição em número, tanto sob condições aeróbias como anaeróbias (JUNEJA et al., 1994). Foi observado que os microrganismos patogênicos *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, podem sobreviver em produtos cárneos embalados sob atmosfera de dióxido de carbono ou vácuo, em temperaturas entre 3 e 8°C, o que levou a um questionamento quanto a segurança microbiológica de alimentos embalados com atmosfera modificada (ÖZBAS et al., 1996). A fim de se obter alimentos com segurança microbiológica garantida, os autores sugerem a incorporação de outros fatores de inibição, como pré-tratamentos com agentes antimicrobianos, cozimento, irradiação, sistemas multi-barreiras, além de um controle estrito da temperatura durante a estocagem do alimento.

De acordo com SHAMSUZZAMAN et al. (1992), o tratamento térmico brando apresenta um efeito pouco significativo sobre *L. monocytogenes* inoculada em peito de frango "sous vide". Tecnologia "sous vide" é o processo caracterizado pelo uso de embalagens a vácuo estáveis ao calor, embalagens de alta barreira, seguido de pasteurização e rápido resfriamento, antes do armazenamento em temperaturas abaixo de 3°C (HANSEN & KNOCHEL, 1996). A literatura indica que *L. monocytogenes* parece sobreviver ao tratamento de pasteurização, quando recuperada em condições de anaerobiose (KNABEL et al., 1990).

Estudos conduzidos para se determinar a influência de vegetais embalados sob atmosfera modificada em relação ao crescimento de *E. coli* O157:H7, mostraram que as misturas gasosas testadas (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 0:5:95; 0:10:90; 5:10:85; 5:20:75; 10:5:85; e 10:20:70 v/v), não afetaram o crescimento desse microrganismo (HAO & BRACKETT, 1993). Esses autores verificaram que a embalagem sob atmosfera modificada não afetou significativamente a tolerância de *E. coli* O157:H7 a 3% NaCl. ABDUL-RAOUF et al. (1993b) estudaram a influência de saladas de alface, pepino e cenoura, embaladas sob atmosfera modificada, no crescimento de *E. coli* O157:H7. Neste trabalho, testou-se o efeito da mistura gasosa O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 3:97 (v/v), sendo verificado a inexistência de um efeito aparente sobre a população de *E. coli* O157:H7.

### **2.2.2.3. Enzimas**

É reconhecido que nem todos os microrganismos submetidos a um processamento térmico são destruídos. Na verdade, um número considerável de microrganismos sobrevive ao processo, encontrando-se em estado de injúria. Tais microrganismos injuriados, são capazes de se recuperarem após o tratamento térmico. Um dos primeiros eventos que ocorrem durante a inativação térmica de microrganismos é a perda de enzimas que protegem as células contra a ação destrutiva do oxigênio e luz (CZECHOWICZ et al., 1996). As enzimas catalase e superóxido dismutase permitem que as células reajam com radicais reativos do oxigênio, como superóxido e peróxido de

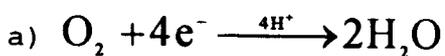
hidrogênio, os quais formam-se espontaneamente na presença de oxigênio. Caso esses radicais permaneçam, a morte celular pode ocorrer como resultado da peroxidação do lipídeo e por danos na membrana celular (KELLOGG & FRIDOVICH, 1975).

Assim, a exposição a tratamentos térmicos subletais, inativam as enzimas catalase e superóxido dismutase de algumas bactérias. Em geral, essas enzimas degradam o peróxido e os íons superóxido presentes nos ambientes aeróbios. As bactérias que apresentam as enzimas catalase e superóxido dismutase inativadas, não são capazes de sobreviverem num ambiente aeróbio, mas podem ser capazes de sobreviverem sob condições anaeróbias, como as encontradas em alimentos embalados a vácuo ou sob certas misturas gasosas utilizadas para embalagens com atmosfera modificada. Além disso, o tratamento térmico de alimentos diminui o potencial de óxido-redução destes (VAHCIC et al., 1992), o que pode contribuir para o aumento da sobrevivência de bactérias injuriadas. Muitos pesquisadores publicaram resultados confirmando esta premissa. BUCKER & MARTIN (1981, 1982) relataram que a atividade de superóxido dismutase em células de *S. aureus* injuriadas pelo calor, diminui com o decorrer do tempo de tratamento térmico. A atividade de catalase em *Staphylococcus* decresceu 10 a 20 vezes a 54,4°C, comparativamente a 37,8°C (AMIN & OLSON, 1968). De acordo com DALLMIER & MARTIN (1988), a atividade específica de catalase produzida por *L. monocytogenes* decresceu rapidamente, quando este microrganismo foi aquecido entre 55 e 60°C. Nesse trabalho, os autores verificaram que superóxido dismutase é ainda mais lábil que catalase, apresentando um declínio de sua atividade quando células de *L. monocytogenes* foram submetidas a tratamento térmico a 45°C.

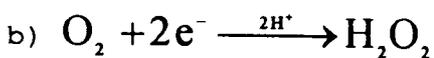
Considera-se que a razão pela qual algumas células injuriadas não se recuperam após o tratamento térmico, é a ausência de agentes reativos ao oxigênio. A exposição de células injuriadas ao ar, geralmente resulta em sua morte, devido sua inabilidade em eliminar os radicais formados durante a incubação aeróbia (MURANO & PIERSON, 1993). Os métodos normalmente utilizados para enumerar células sobreviventes de um tratamento térmico, podem não ser eficientes para detectar as células injuriadas. Tipicamente, esses métodos envolvem uma etapa de incubação sob condições aeróbias. KNABEL et al. (1990) verificaram que a enumeração de células de *L. monocytogenes*

injurizadas pelo calor, utilizando-se técnicas estritamente anaeróbicas, resultou em um aumento significativo no número de microrganismos detectados, comparado com a enumeração sob condições aeróbicas. GEORGE et al. (1997), obtiveram uma maior recuperação de células de *E. coli* O157:H7 linhagem 204P submetidas a tratamento térmico em meio anaeróbio, enquanto que, em meio preparado sob 40% de oxigênio, observou-se pequena recuperação celular. UGBOROGHO & INGHAM (1994) relataram que, tanto as condições reduzidas do meio submetido a tratamento térmico, quanto os métodos anaeróbicos de enumeração, levaram a um aumento da sobrevivência de células de *S. aureus* termicamente injurizadas. Um procedimento de reparo eficaz, baseado em ágar em dupla camada, foi desenvolvido por RAY & SPECK (1978), possibilitando a recuperação de bactérias em condições de baixas concentrações de oxigênio.

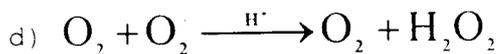
Uma teoria que se tornou popular explica a razão pela qual o oxigênio apresenta efeito bactericida sobre bactérias anaeróbicas, submetidas a um estresse (ANDERSON & FUNG, 1983). De acordo com esta, a formação de radicais livres é associada a perda da viabilidade desses microrganismos após a exposição ao oxigênio (COX & HECKLY, 1973). A maior parte do oxigênio presente em um sistema biológico é reduzido a água (a).



Parte do oxigênio que sobra, é convertido a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (b) e superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (c).



O peróxido de hidrogênio é um bom agente oxidante, porém sozinho não é letal a célula (GREGORY & FRIDOVICH, 1974). Por outro lado, o radical superóxido, embora fraco agente oxidante e fraco radical livre, pode formar peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) (d/e).

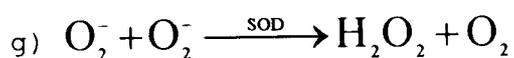


O OH• é um radical livre forte e tóxico a bactérias (GREGORY & FRIDOVICH, 1974). Esse composto é capaz de desencadear uma série de reações entre radicais livres e componentes celulares, podendo ser letal a célula (f) (MORRIS, 1976; AHERN, 1991).



O papel do oxigênio na produção de radical hidroxila (OH•), parece ser o de catalisador. O superóxido deve ser necessário para a regeneração de L-dTm (metal de ligação bivalente, como o Fe<sup>++</sup>).

A defesa da célula contra a produção de OH• envolve as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase.



A reação catalisada por enzima (g) é mais rápida que a reação não enzimática (d). Assim, a superóxido dismutase extingue a presença de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, de modo que, este não estará presente para a produção de OH•. A conversão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, através de catalase (h) também previne a produção de OH•. Estas duas enzimas atuando conjuntamente, são mais eficazes na proteção da célula, do que individualmente.

Um período de recuperação estritamente anaeróbio pode eliminar o estresse oxidativo pela exclusão do oxigênio, o precursor necessário para a formação de radicais tóxicos de oxigênio (KNABEL et al., 1990).

Portanto, para se auxiliar na recuperação de uma célula bacteriana injuriada, é necessário que o meio de cultura possua a propriedade de reagir com o oxigênio. A

adição de catalase ao meio, minimiza a produção de espécies de oxigênio indesejáveis e melhora o processo de recuperação celular (CZECHOWICZ et al., 1996). Meios suplementados com compostos que degradam peróxido de hidrogênio ou bloqueiam sua formação, melhoraram a recuperação de células de *E. coli* injuriadas por calor (McDONALD et al., 1983). McCLEERY & ROWE (1995) relataram que a adição de catalase ao meio de cultura, aumentou a recuperação de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas por tratamento térmico. A adição de catalase ao meio de enumeração aumentou a recuperação de células injuriadas de *S. aureus* sob condições aeróbias (MARTIN et al., 1976; BREWER et al., 1977).

Identificou-se em *E. coli* dois tipos de enzimas catalase, distintas estruturalmente. A catalase HPI (codificada pelo gene KatG) e a catalase HPII (produzida pelo gene KatE) (LOEWEN, 1984). Essas enzimas exercem um papel protetor da célula em diferentes circunstâncias. A catalase HPI, é um constituinte do sistema adaptativo da célula, exercendo sua função durante o estágio de crescimento, enquanto que, a produção de catalase HPII é induzida apenas durante a fase estacionária de crescimento. O nível de catalase HPI, é relacionado ao oxigênio presente nas condições de crescimento. Quanto maior a concentração de oxigênio presente no ambiente, maior é a produção de peróxido de hidrogênio, sendo necessário mais catalase HPI para degradá-lo. Assim, o acúmulo de peróxido de hidrogênio inicia o processo de transição da catalase HPI e regula sua quantidade (CHRISTMAN et al., 1985). A catalase HPII, por sua vez, protege o material genético da célula durante o estresse oxidativo na fase estacionária. Dessa forma, o aumento da sensibilidade de células injuriadas pelo calor a baixos níveis de peróxido de hidrogênio, não se deve a diminuição da atividade total de catalase, mas pode estar relacionada a inativação ou perda de catalase HPI (MACKEY & SEYMOUR, 1987).

Um gene que codifica a atividade de catalase e peroxidase de *E. coli* O157:H7, foi identificado num fragmento de DNA 9,7 Kb, o qual é derivado do plasmídeo pO157 (BRUNDER et al., 1996).

#### 2.2.2.4. *Potencial de óxido-redução*

O potencial de óxido-redução é um dos fatores de maior importância para os sistemas biológicos. O processo de óxido-redução é definido em termos da migração de elétrons entre compostos químicos. A oxidação é a perda de elétrons, enquanto que, redução é o ganho de elétrons. Quando uma substância é oxidada (ou seja, libera elétrons), a outra é simultaneamente reduzida (recebe os elétrons liberados) (BROWN & EMBERGER, 1980). Portanto, a substância que doa elétrons é um agente redutor, enquanto a outra que adquire os elétrons, é o agente oxidante. A relação entre redução e oxidação pode ser assim escrita:



Quanto mais oxidada for a substância, mais positivo será seu potencial elétrico, por outro lado, quanto mais reduzida a substância, mais negativo será seu potencial elétrico. O potencial de óxido-redução pode ser determinado por voltagem (em volts ou milivolts), quando um eletrodo de metal nobre, inerte (platina, ouro, irídio), é conectado a um eletrodo de referência e ambos são colocados em solução contendo um sistema de óxido-redução reversível (JACOB, 1970).

Segundo LUND & WYATT (1984), o potencial de óxido-redução de um alimento ou meio de cultura é determinado pelo balanço existente entre os agentes oxidantes e redutores presentes. O potencial de óxido-redução é dependente dos seguintes fatores:

- Composição do alimento ou meio, em especial da natureza e concentração de substâncias redutoras, tais como, aminoácidos contendo tiol, peptídeos, proteínas e açúcares redutores.
- pH.
- Pressão parcial de oxigênio presente.

Embora o potencial de óxido-redução não seja normalmente utilizado como parâmetro para o processamento de alimentos, ele interage com o pH e a atmosfera

gasosa para determinar a microbiota deterioradora de muitos alimentos. O potencial de óxido-redução do interior de um corte de carne é suficientemente reduzido para prevenir o crescimento de microrganismos aeróbios (entre eles, *Pseudomonas*, bacilos ou fungos), porém o potencial de óxido-redução reduzido (por exemplo em carnes em estado "post rigor"), permite o crescimento de Enterobacteriaceae e *Clostridium* sp. (BROWN & EMBERGER, 1980). A queda do potencial de óxido-redução em produtos alimentícios, depende da taxa de crescimento e do tipo fisiológico das bactérias presentes.

Na maioria dos casos, o alto potencial de óxido-redução em alimentos ou meio de cultura, é atribuída a presença de oxigênio (HUNGATE, 1969), sendo que, a inibição de microrganismos anaeróbios em condições elevadas de potenciais de óxido-redução é devido mais a presença de oxigênio dissolvido, do que pelo potencial de óxido-redução por si só. Ocorre que, um alto potencial de óxido-redução causado por outros agentes oxidantes, pode não ser inibitório (LUND & WYATT, 1984).

É estabelecido que o potencial de óxido-redução é um importante fator determinante do crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios (MONTVILLE & CONWAY, 1982). Microrganismos aeróbios necessitam de valores de potencial de óxido-redução mais elevados para seu crescimento, enquanto os anaeróbios, requerem valores de potencial de óxido-redução negativos (BROWN & EMBERGER, 1980). Se o potencial de óxido-redução de uma solução nutritiva for medido, e esta solução for então inoculada com microrganismos, uma mudança do potencial de óxido-redução para um valor mais negativo indica o início do crescimento microbiano. A determinação do nível de oxigênio, realizada simultaneamente, mostra um decréscimo da pressão de oxigênio (JACOB, 1970). Em diferentes culturas de microrganismos, o valor de potencial de óxido-redução pode variar entre -420 mV (anaerobiose) e +300 mV (aerobiose) (BROWN & EMBERGER, 1980). O valor baixo de potencial de óxido-redução é considerado o fator principal que contribui para o crescimento de microrganismos facultativos injuriados por tratamento térmico (DUBOS; NELSON, citados por KNABEL et al., 1990) .

MONTVILLE & CONWAY (1982), determinaram o potencial de óxido-redução de vários alimentos. Foi determinado, que os alimentos acondicionados em vidro apresentam maior potencial de óxido-redução que os enlatados. Esse efeito foi atribuído a ocorrência de reações de foto-oxidação nos produtos acondicionados em embalagens de vidro. SNYDER (1996) determinaram o potencial de óxido-redução de alimentos de "delicatessen", como lasanha e refeições a base de frango. Foi verificado que o potencial de óxido-redução desses alimentos, que variava entre -198 e -23 mV, é suficiente para permitir o crescimento de *Clostridium botulinum*.

#### **2.2.2.5. Choque térmico**

Quando bactérias são expostas a temperaturas alguns graus superiores a sua temperatura normal de crescimento, as células induzem a síntese de proteínas (MACKEY & DERRICK, 1986), tornando-as mais capacitadas a resistir a exposição a um subsequente tratamento térmico (GADZELLA & INGHAM, 1994). Esse fenômeno é conhecido como "resposta ao choque térmico", e é considerada universal. Foi observado em bactérias como: *Bacillus* spp (STREIPS & POLIO, 1985); *Salmonella* spp (MACKEY & DERRICK, 1986); *Legionella pneumophila* (LEMA et al., 1988); *Escherichia coli* (GADZELLA & INGHAM, 1994); *Listeria monocytogenes* (KNABEL et al., 1990; LINTON et al., 1990); *E. coli* O157:H7 (MURANO & PIERSON, 1992, 1993); além de células eucarióticas, tais como leveduras (McALISTER & FINKELSTEIN, 1980); *Drosophila* (CRAIG, 1985); células de mamíferos (HAHN & LI, 1982) e fungos (PLESOFISKY-VIG & BRAMBL, 1985).

LINTON et al. (1992), consideraram que os fatores que afetam a resistência térmica de microrganismos são: a condição fisiológica do microrganismo, o meio de enumeração e as condições de crescimento. Os autores submeteram células de *L. monocytogenes* Scott A a choque térmico de 48°C por 10 minutos, em caldo tripticase de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSBYE), seguido de tratamento térmico a 55°C por 50 minutos. Os meios de enumeração não seletivo (TSBYE) e seletivo (McBride

Listeria-ML), usados para determinação da resistência térmica deste microrganismo, foram incubados sob condições de aerobiose e anaerobiose. Verificou-se uma maior recuperação das células submetidas a choque térmico e enumeradas em meio anaeróbio não seletivo.

GADZELLA & INGHAM (1994) investigaram os efeitos do choque térmico sobre a sobrevivência de *E. coli* ATCC 25922, seguido de tratamento térmico a 52, 54 e 56°C. Em caldo nutriente nas temperaturas testadas, foram observados valores D mais elevados, em células previamente submetidas a choque térmico a 46°C por 1 hora. Esse efeito foi mais pronunciado a 56°C, seguindo-se a 54 e 52°C.

FARBER & BROWN (1990) inocularam embutidos cárneos com *L. monocytogenes* submetida a choque térmico a 48°C por 30, 60 e 120 minutos, antes de expor a tratamento térmico de 62 ou 64°C. As células pré-aquecidas durante 120 minutos, apresentaram maior aumento de tolerância térmica, quando comparadas a células não submetidas a choque térmico, apresentado um aumento médio de 2,4 vezes no valor D. Esta tolerância térmica adquirida, foi mantida por pelo menos 24 horas após o choque térmico. FEDIO & JACKSON (1989) relataram que o pré-aquecimento de uma suspensão de células de *L. monocytogenes* a 48°C por 1 hora, em meio de cultura e em leite, resultou num significativo aumento na resistência térmica deste microrganismo.

MACKAY & DERRICK (1986) observaram o aumento da sobrevivência de células de *Salmonella typhimurium* pré-incubadas a 42, 45 ou 48°C, e submetidas a subsequente tratamento térmico a 55°C por 25 minutos. Células de *Bacillus* expostas a um tratamento térmico brando ou choque-térmico, produziram proteínas de choque térmico, aumentando sua resistência, quando expostas a altas temperaturas (STREIPS & POLIO, 1985).

O efeito do choque térmico em células de *L. monocytogenes* e *S. typhimurium*, foi também determinado a 35, 42, 48 e 52°C, seguido de tratamento térmico de 57,8 ou 52°C (BUNNING et al., 1990). Observou-se que o aumento da tolerância térmica induzida pelo choque térmico foi significativa para *S. typhimurium*, porém não para *L. monocytogenes*. Os experimentos realizados com *L. monocytogenes* sugerem que a tolerância térmica

induzida não é mantida por um longo período de tempo, caso a temperatura do choque térmico não seja mantida. Assim, a tolerância térmica adquirida após choque térmico a 42°C, retornou aos níveis obtidos pelo controle em 1 hora, quando células de *L. monocytogenes* submetidas ao choque térmico foram incubadas a temperatura de 35°C, e permaneceu em seu nível máximo por pelo menos 4 horas, quando a temperatura de choque térmico de 42°C foi mantida.

De acordo com MURANO & PIERSON (1992), células de *E. coli* O157:H7 cultivadas sob condições de aerobiose a 30°C, e submetidas a choque térmico a 42°C por 5 minutos, apresentaram maior número de sobreviventes após subsequente tratamento térmico a 55°C. Assim, o choque térmico apresentou um aumento da resistência térmica de *E. coli* O157:H7. Estes mesmos pesquisadores detectaram uma proteína de peso molecular de 71.000 Daltons em células de *E. coli* O157:H7 submetidas a choque térmico. Essa proteína parece ser imunologicamente similar a subunidade sigma<sup>32</sup> de RNA polimerase, a qual é considerada uma proteína de estresse (GROSSMAN et al., 1987).

Em alguns casos, as proteínas associadas a um estímulo podem ser induzidas durante outros estresses. Assim, várias proteínas de *E. coli* sintetizadas em decorrência do choque térmico, podem ser também sintetizadas quando as células são expostas ao peróxido de hidrogênio e etanol (Van BOGELEN et al., 1987), luz UV (KREUGER & WALKER, 1984), e por privação de aminoácidos (GROSSMAN et al., 1985). Foi verificado em *E. coli*, que a privação de glicose ou nitrogênio (JENKINS et al., 1988) podem conduzir ao aumento de resistência térmica ou oxidativa. SPECTOR et al. (1986) mostraram que células de *S. typhimurium*, cultivadas sob condições de anaerobiose, sintetizaram proteínas de choque térmico, sugerindo que o crescimento em condições anaeróbicas por si só, pode ser considerado um fator de estresse para a célula e, assim, induzir a síntese de proteínas do choque térmico.

WANG & DOYLE (1996) estudaram a influência do choque térmico na tolerância ao ácido de *E. coli* O157:H7. Testou-se a habilidade de sete linhagens de *E. coli* O157:H7 e uma de *E. coli* K-12, de sobreviverem a pH 2,5 a 37°C. A sobrevivência das

células submetidas a choque térmico (10 minutos a 48°C) foi 10 a 100 vezes maior, comparada às células não submetidas a tratamento térmico. Esses resultados indicaram, que um tratamento térmico subletal para *E. coli* O157:H7 aumenta substancialmente sua tolerância a condições de acidez. Isto pode ter implicações práticas para alimentos que recebem tratamento térmicos brandos e são conservados por ácidos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

As determinações experimentais foram realizadas no Institute of Food Research, Norwich Laboratory, Norwich, Reino Unido, no laboratório do Dr. Michael William Peck, através de bolsa “doutorado sanduíche no exterior” (processo nº 201301/95-4), concedida ao autor pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

#### **3.1. Microrganismo**

*E. coli* O157:H7, linhagem 204P, foi utilizada neste estudo. Esta foi originalmente isolada de carne suína, e fornecida pelo Dr. M. P. Doyle, Universidade da Geórgia, Griffin, Geórgia, Estados Unidos. A cultura foi mantida em ágar triptona de soja (TSA, CM131, Unipath, Reino Unido), a 4°C.

#### **3.2. Preparo dos meios**

##### **3.2.1. Meios de cultura**

*E. coli* O157:H7 foi subcultivada em caldo triptona de soja (TSB, CM129, Unipath, Reino Unido). O cultivo, tratamento térmico e recuperação foram realizados em meio triptona de soja acrescido de 0,3% de extrato de levedura (L21, Unipath, Reino Unido) e 1% de glicose (BDH) (caldo TSYGB). No meio TSYGB, foi adicionado um indicador de potencial de óxido-redução, resarzurina a 0,0001% (5 ml/l de solução estoque 0,02% - BDH), indicando condições de aerobiose (coloração rósea) ou anaerobiose (incolor). O meio foi fervido em balão de fundo chato acoplado com frasco plástico, de modo a evitar perdas de líquido durante esta etapa. A fervura dos meios foi realizada

por aproximadamente 15 minutos, sob atmosfera de nitrogênio ( $N_2$ ) para remoção do ar atmosférico, e então, este foi transferido para banho de gelo para resfriamento sob o mesmo gás. Cisteína-HCl (0,2 g/l, BDH) foi adicionada ao meio preparado sob misturas gasosas anaeróbias, tornando-o reduzido. Todos os meios foram borbulhados com as misturas gasosas testadas, as quais foram injetadas diretamente no líquido, durante 30 minutos. Os gases anaeróbios foram conduzidos através da coluna Hungate (FIGURA 1), para remoção dos traços de oxigênio. Utilizou-se as misturas gasosas  $H_2/N_2$ , 10:90 (v/v) ou  $H_2/CO_2/N_2$ , 10:50:40 (v/v/v), para o preparo dos meios anaeróbios, e  $O_2/N_2$ , 0,5:99,5; 1:99; 2:98; 5:95; 20:80 (v/v) ou  $O_2/CO_2/N_2$ , 20:50:30 (v/v/v), para o preparo dos meios aeróbios. Os gases foram obtidos da British Oxygen Company Special Gases (London, Reino Unido). Os meios preparados sob dióxido de carbono, foram ajustados com KOH até pH 6,5-6,6. A distribuição dos meios foi realizada utilizando-se a técnica de Hungate (HUNGATE, 1969), em lotes de 5, 9, 50 e 100 ml, contidos em frascos de 10, 15, ou 125 ml (Pierce and Warriner, Chester, Reino Unido). Antes de se iniciar a distribuição dos meios, injetou-se o gás testado nos frascos para remoção do ar. Cuidou-se para evitar a introdução de oxigênio nos meios reduzidos, sendo que, qualquer frasco contendo meio oxidado (detectado pela presença de coloração rósea na superfície do meio), foi descartado. Estes foram fechados com septos de borracha (Wheaton, Millville, NJ, Estados Unidos), e lacrados com tampas de alumínio (The West Co. (UK) Ltd., St. Austell, Reino Unido), antes da autoclavação a 121°C por 15 minutos.

### **3.2.2. Meio de cultura a base de alimentos**

Inicialmente, os alimentos sólidos testados foram picados e acrescidos de água destilada, na proporção de metade do peso do alimento. Seguiu-se etapa de cozimento em banho de água fervente, durante 15 a 20 minutos. O alimento cozido foi homogeneizado com o auxílio de liquidificador (Atomix,

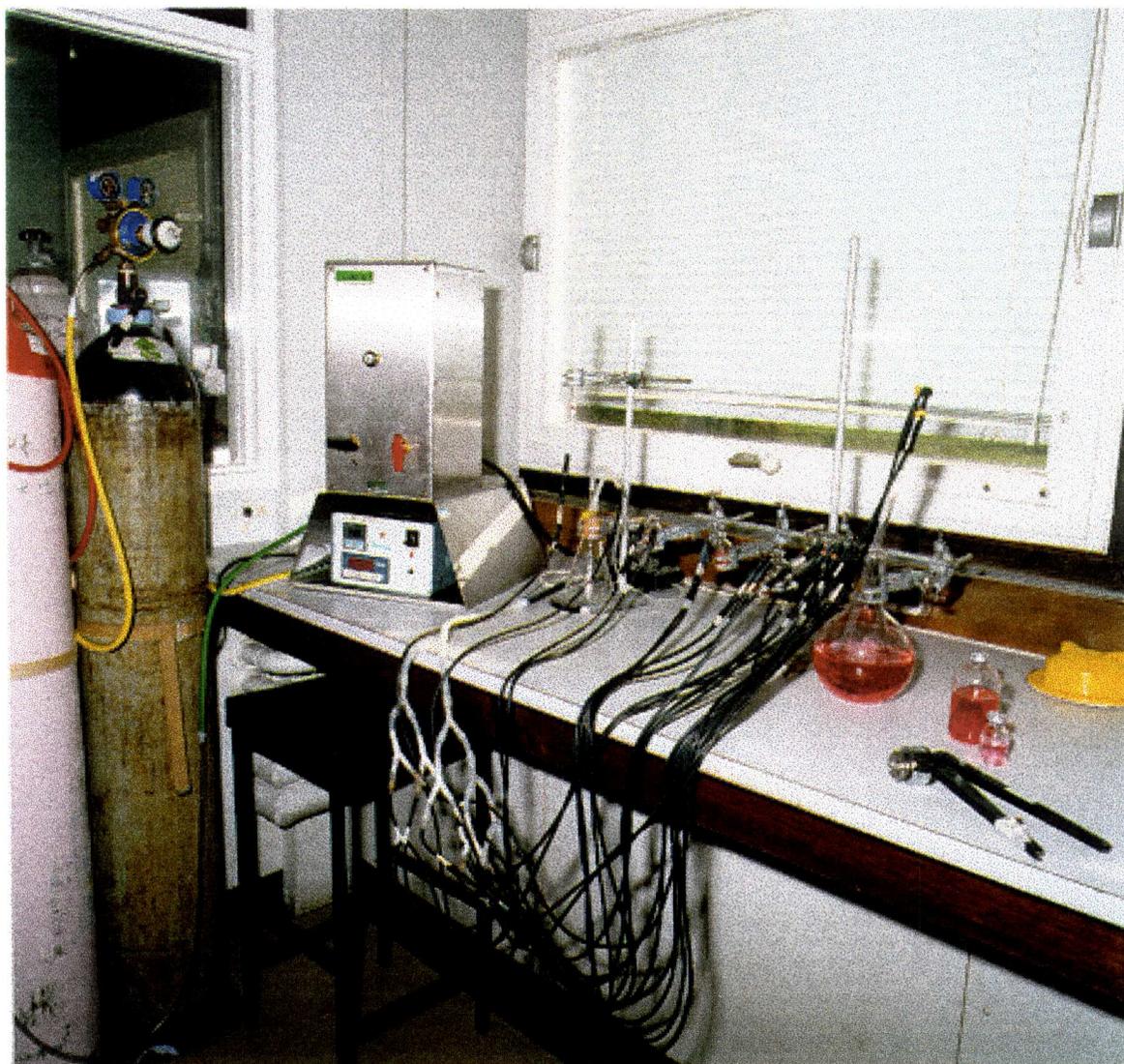


FIGURA 1. Preparo de meio TSYGB para *E. coli* O157:H7, de acordo com a técnica de Hungate.

MSE, Reino Unido) e, a seguir, adicionou-se mais água até obter-se a consistência de um purê. Glicose (0,2%) foi adicionada em todos os meios, exceto para o meio a base de cogumelo. As proporções de alimento e água utilizadas para o preparo dos purês estão indicadas na TABELA 1. O meio foi então dividido igualmente entre dois frascos, acoplados com frasco plástico para minimizar perdas de umidade por evaporação e, então, os mesmos foram aquecidos em banho de água fervente por 15 minutos, para remoção do oxigênio dissolvido. A seguir, os frascos foram submetidos a borbulhamento com gás anaeróbico ( $H_2/N_2$ , 10:90 v/v), conduzido através da coluna Hungate, ou gás aeróbico ( $O_2/N_2$ , 20:80 v/v), enquanto estavam sendo resfriados em gelo por 1 hora. Para o preparo do meio a base de leite, acrescentou-se 0,2% de glicose, seguindo-se de agitação delicada para homogeneização. Os frascos contendo o meio de leite foram aquecidos durante 15 minutos em banho de água fervente, para a remoção do ar, e então, borbulhados com o gás aeróbico ou anaeróbico, conforme descrito para o preparo dos meios de alimentos sólidos. Para a distribuição dos meios, alíquotas de 20 ml foram pipetadas em tubos, sob fluxo do mesmo gás utilizado na preparação do meio. Os tubos foram fechados com septos de borracha e lacrados com tampa de alumínio. Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Os alimentos testados foram: carne bovina (moída, congelada, com 18,6% de gordura e concentração final de gordura de 9,3%); carne de frango (filés de peito de frango, sem pele, refrigerados, com 5% de gordura e concentração final de gordura de 2,8%); leite desnatado (UHT, 0,1% de gordura); leite integral (UHT, 3,8% de gordura); batata; brócolis; cenoura; cogumelo (frescos).

TABELA 1. Proporção água:alimento utilizada no preparo dos meios.

<b>Alimento</b>	<b>Proporção alimento:água (v/v)</b>
batata	1:2
brócolis	1:1
cenoura	1:1
carne bovina	1:1
carne de frango	4:3
cogumelo	1:1
leite desnatado	1:0
leite integral	1:0

### **3.3. Curva de crescimento de *E. coli* O157:H7 sob condições aeróbias e anaeróbias**

*E. coli* O157:H7 foi subcultivada em 10 ml de caldo triptona de soja (TSB) e incubada por 24 horas a 30°C. Realizou-se diluição seriada da cultura até 10<sup>-5</sup> em água peptonada (PSDF: Bacto peptona [Difco] - 1 g; NaCl - 8,5 g; água destilada - 1 l, pH 7,0) (ICMSF, 1978). Inoculou-se 2 ml da suspensão diluída em 2 frascos contendo 100 ml de meio TSYGB, preparado sob condições aeróbias (O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) ou anaeróbias (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v). Os meios foram gentilmente agitados. Imediatamente, retirou-se uma alíquota de 1 ml (tempo zero) de cada frasco, sob condições estéreis. Os frascos foram incubados por 25 horas a 30°C.

As alíquotas de suspensão celular foram diluídas em água peptonada até 10<sup>-7</sup> e, 0,1 ml de cada amostra diluída foi plaqueado (em duplicata) em meio ágar triptona de soja (TSA), seguindo-se de incubação por 2 dias a 30°C para contagem das colônias. As amostragens foram realizadas em

intervalos de 1 hora durante as 14 horas iniciais, e após 24 e 25 horas. Para a determinação da fase estacionária de crescimento de *E. coli* O157:H7, foram traçadas duas curvas, uma em condição de aerobiose e outra em anaerobiose, a partir da média (de duas medidas) de recuperação bacteriana em função do tempo.

### **3.4. Preparo de suspensão celular para tratamento térmico**

*E. coli* O157:H7 foi subcultivada em 10 ml de meio TSB, e incubada a 30°C por 24 horas, para obtenção de cultura em fase de crescimento estacionária.

A cultura utilizada no tratamento térmico realizado em meio TSYGB foi submetida a diluição seriada em água peptonada (PSDF, ICMSF, 1978). A seguir, foram inoculados 2 ml da diluição  $10^{-5}$  ( $10^4$  células/ml) da suspensão em dois frascos de 100 ml de TSYGB, preparados sob condições aeróbias ( $O_2/N_2$ , 20:80 v/v) ou anaeróbias ( $H_2/N_2$ , 10:90 v/v). Os meios foram incubados por 24 horas a 30°C, e então, transferidos para tubos de centrifuga de 250 ml esterilizados, sob injeção do mesmo gás utilizado para o preparo do meio. As culturas foram centrifugadas a 5.520 g a 4°C por 20 minutos, e as células resuspensas em 2 ml do sobrenadante, para obtenção de aproximadamente  $10^{11}$  células/ml.

### **3.5. Tratamentos térmicos**

#### **3.5.1. Em meio de cultura**

Inicialmente, determinou-se o tempo necessário para que os tubos e frascos contendo meio de cultura atingissem as temperaturas dos banhos utilizados para o tratamento térmico e resfriamento. Para isso, foram

preparados tubos e frascos contendo 10 e 100 ml de meio TSYGB, sob condições aeróbias ou anaeróbias. Os tubos e frascos contendo termopares de agulha foram imersos em banho pré-aquecido à temperatura de 59°C. Cronometrou-se o tempo necessário, para que o meio contido no tubo e no frasco atingisse a mesma temperatura do banho. Ao término do período de aquecimento, determinou-se o tempo necessário para o resfriamento dos meios. Para isso, os tubos e frascos foram removidos do banho de tratamento térmico e submersos em um segundo banho, contendo água com gelo, seguindo-se de agitação para rápido resfriamento dos mesmos. Quando os termopares indicaram 30°C ou menos, os tubos foram removidos. Similarmente, foi verificado se o volume de suspensão de *E. coli* O157:H7 a ser submetido ao tratamento térmico, acarreta oscilações de temperatura no meio pré-aquecido. Para isso, foram preparados tubos e frascos contendo 10 e 100 ml de meio TSYGB, os quais foram conectados a termopares de agulha e imersos em banho pré-aquecido a temperatura de 59°C. Quando os tubos e frascos atingiram a temperatura do banho, foram injetados, respectivamente, 0,1 e 1,0 ml de suspensão de *E. coli* O157:H7.

A suspensão celular foi submetida a tratamento térmico, utilizando-se a técnica adaptada do método dos tubos submersos de KOOIMAN & GEERS (1975). O frasco contendo o meio a ser tratado termicamente, continha 50 ou 100 ml de meio TSYGB, preparado sob condições de aerobiose ou anaerobiose, respectivamente. Este foi totalmente submerso em banho pré-aquecido, na temperatura a ser testada. Como o calor faz com que o oxigênio presente no meio se dirija para o espaço-livre, tornando o meio reduzido, o frasco com o meio foi agitado para solubilização do oxigênio (KNABEL et al., 1990). A seguir, o frasco foi perfurado com agulha estéril, através do septo de borracha, para liberação da pressão dos mesmos. Os meios aeróbio e anaeróbio foram inoculados, com respectivamente, 0,5 ou 1 ml da suspensão contendo  $10^{11}$  células/ml (preparada conforme item 3.4.), usando-se seringa (Microlance 3, Becton Dickinson) acoplada com agulha hipodérmica longa (0,8 x 40 mm, Terumo Europe N.V.), de modo a se obter

aproximadamente  $10^9$  células/ml. Cuidou-se para que o inóculo fosse injetado diretamente nos meios de tratamento térmico, evitando-se que esse tocasse as paredes do frasco. Após o tratamento térmico, o frasco foi imediatamente resfriado em água com gelo, durante 1 minuto.

### **3.5.2. Em meios a base de alimentos**

Para os tratamentos térmicos realizados em meios a base de alimentos, células de *E. coli* O157:H7 em fase estacionária de crescimento foram submetidas a diluição seriada em água peptonada obtendo-se suspensões contendo de  $10^3$  a  $10^9$  células/ml, estimadas pela contagem dos microrganismos viáveis em placa de meio ágar triptona de soja (TSA). Imediatamente antes do tratamento térmico, com o auxílio de seringa e agulhas estéreis, cinco tubos contendo meios aeróbios e anaeróbios foram inoculados com 0,1 ml das suspensões diluídas (utilizou-se pelo menos três diluições da suspensão celular). Os tubos inoculados foram distribuídos regularmente em grades. Cada um dos meios a base de alimentos (preparados sob aerobiose e anaerobiose), foi submetido a tratamentos térmicos individuais. Para o monitoramento da temperatura, foram distribuídos pela grade, seis tubos de alimentos não inoculados, contendo termopares de agulha. A grade de tubos foi imersa em banho pré-aquecido em duas temperaturas de referência (59 e 61°C). A cronometragem do tempo de tratamento térmico foi iniciada quando todos os seis termopares indicaram 1°C abaixo da temperatura de referência. Os alimentos foram submetidos a tratamento térmico em intervalos de tempos diferenciados de 10, 15 e 20 minutos a 59°C e, de 1 e 1,5 minutos a 61°C. Ao término do tratamento térmico, a grade de tubos foi removida do banho, e submersa em um segundo banho contendo água com gelo, seguindo-se de agitação para rápido resfriamento dos tubos. Quando os seis termopares indicaram 25°C ou menos, os tubos foram removidos e incubados a 30°C durante duas

semanas. A FIGURA 2 ilustra os equipamentos utilizados para este experimento.

### **3.6. Avaliação dos tratamentos térmicos aplicados em alimentos**

As temperaturas foram registradas a cada cinco segundos (aquisitor de dados Anville 420, Anville Instruments, Camberley, Surrey, Reino Unido; e respectivo software), de acordo com FERNANDEZ et al. (1997).

Para o cálculo do tempo equivalente a temperatura de referência, foram incluídos o efeito do tempo de subida de temperatura e de resfriamento na letalidade total. Para isso, utilizou-se a seguinte equação (PECK et al., 1995):

$$L = 10^{[(T_m - T_t)/z]}$$

$T_m$  = temperatura medida.

$T_t$  = temperatura de referência.

$z$  = coeficiente térmico do microrganismo, considerado 4°C (LINE et al., 1991).

### **3.7. Detecção do crescimento**

#### **3.7.1. Em meios de cultura**

A enumeração de *E. coli* O157:H7 foi realizada imediatamente após o tratamento térmico (tempo zero) e em intervalos, enquanto as células



FIGURA 2. Tratamento térmico de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

submetidas a tratamento térmico nas temperaturas testadas estavam sendo incubadas. Para isso, utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP), em série de cinco frascos. Alíquotas de 1 ml das amostras foram submetidas a diluições decimais seriadas em 9 ml de meio TSYGB, preparado sob a mesma mistura gasosa do meio em que foi realizado o tratamento térmico e, pelo menos, cinco diluições foram inoculadas, em cinco frascos (0,1 ml da suspensão diluída, em 5 ml do meio de enumeração testado), para a determinação do NMP. Estes frascos de enumeração foram incubados a 30°C por uma semana. Os frascos das maiores diluições que apresentavam crescimento positivo, evidenciado por turbidez no meio, foram estriados em placas de meio TSA, para checagem de contaminação. Os valores de NMP foram calculados pelo método de HURLEY & ROSCOE (1983).

### **3.7.2. Em meios a base de alimentos**

Realizou-se testes preliminares, para determinação de métodos para detecção de crescimento de *E. coli* O157:H7 em meios de alimentos. Inoculou-se *E. coli* O157:H7 nos tubos com alimentos esterilizados, os quais foram incubados a 30°C por uma semana. Nos tubos contendo carne bovina, carne de frango, cogumelo, batata, cenoura e brócolis, o crescimento do microrganismo foi evidenciado pela produção de gás (bolhas no alimento), ou por forte pressão positiva no tubo (detectada pela liberação de gás após a inserção de agulha através do septo de borracha). O crescimento do microrganismo nos tubos de leite, foi evidenciado pela produção de ácido, medido através da mudança do pH. Antes da inoculação, o pH do leite variava entre 6,2 a 6,5. Os tubos com crescimento positivo, deveriam apresentar queda de, ao menos, uma unidade no valor de pH. A detecção de crescimento, de acordo com os métodos citados, foi realizada após o período de incubação de 2 semanas, a 30°C.

Para o cálculo do valor D, utilizou-se a seguinte equação:

$$D = t/(\log N_0 - \log N)$$

- t = tempo equivalente na temperatura teste.
- $N_0$  = nível de inóculo obtido pela contagem dos microrganismos viáveis, realizado em placas aeróbias.
- N = número mais provável (NMP) de sobreviventes, calculado a partir do número de frascos que apresentaram crescimento positivo após duas semanas a 30°C.

### **3.8. Efeito das temperaturas equivalentes de tratamento térmico na recuperação de células de *E. coli* O157:H7**

As temperaturas testadas foram 55, 59 e 61°C. Os tempos de tratamentos térmicos requeridos foram determinados por curvas de morte térmica utilizando-se o método dos tubos submersos (KOOIMAN & GEERS, 1975). Tubos de rosca com septo de borracha, contendo 10 ml de meio TSYGB preparado sob condições de anaerobiose ( $H_2/N_2$ , 10:90 v/v), foram pré-aquecidos em banho na temperatura a ser testada. Os tubos foram agitados, seguindo-se de liberação da pressão interna com a introdução de agulha estéril. Estes foram então inoculados com 100  $\mu$ l da suspensão contendo  $10^{11}$  células/ml (preparada conforme item 3.4.), utilizando-se seringa Hamilton e agulha hipodérmica longa, de modo que a suspensão pudesse ser injetada diretamente no meio aquecido. Após os tempos de aquecimento requeridos, os tubos foram removidos e submersos em água com gelo por 1 minuto. Um tubo não submetido a tratamento térmico (tempo zero) foi inoculado, e imerso diretamente em água com gelo. As células

foram enumeradas, tanto em meio TSYGB anaeróbio como aeróbio, para determinação do NMP, em série de cinco frascos, conforme descrito no item 3.7.1.. Os valores de NMP foram plotados contra o tempo de aquecimento para a obtenção das curvas de inativação térmica.

Os tratamentos térmicos foram determinados a partir das curvas de inativação térmica. Foram determinados tempos de tratamento térmico que resultassem nas reduções decimais de 3 a 4 ciclos log (D) para as células recuperadas em condições anaeróbias e, 5 a 6 ciclos log para as células recuperadas em condições aeróbias. As células foram submetidas a tratamento térmico em meio anaeróbio, resfriadas em banho de gelo por 1 minuto e incubadas a 30°C. As amostras foram enumeradas em meio preparado em aerobiose (O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) e anaerobiose (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v) (item 3.7.1.).

### **3.9. Efeito do cultivo, tratamento térmico e incubação sob condições aeróbias ou anaeróbias, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7**

Células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas, submetidas a tratamento térmico por 5 minutos a 59°C em 50 ml de meio TSYGB aeróbio (preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) ou 100 ml de meio TSYGB anaeróbio (preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v). Seguiu-se de resfriamento por 1 minuto e incubação a 30°C. As amostras foram diluídas no mesmo meio utilizado para o tratamento térmico e a incubação foi realizada em meio aeróbio e anaeróbio, conforme descrito anteriormente (item 3.7.1.).

### **3.10. Efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico**

Células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas e submetidas a tratamento térmico sob condições anaeróbias, por 5 minutos a 59°C, e resfriadas em banho de gelo por 1 minuto. Os frascos contendo as células submetidas a tratamento térmico, foram então incubados a 5, 10, 20 e 30°C. A amostragem foi realizada em intervalos, e as células enumeradas conforme descrito anteriormente (item 3.7.1.), tanto em meio preparado em aerobiose (O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v), quanto em anaerobiose (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v).

### **3.11. Efeito de gás carbônico e diferentes concentrações de oxigênio na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico**

Testou-se o efeito da inclusão de 50% CO<sub>2</sub> e de diferentes concentrações de O<sub>2</sub>, nos meios de enumeração incubados em aerobiose e em anaerobiose, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas termicamente. Células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas, submetidas a tratamento térmico em condições de anaerobiose por 5 minutos a 59°C, resfriadas em banho de gelo por 1 minuto e incubadas a 30°C. As células foram enumeradas conforme descrito no item 3.7.1., em meios preparados sob mistura gasosa contendo 50% CO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:50:30 v/v/v e H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:50:40 v/v/v), diferentes concentrações de O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 0,5:99,5; 1:99; 2:98; 5:95; 20:80 v/v), além dos meios utilizados como controle (preparados sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v e H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v).

### **3.12. Efeito do choque térmico na resistência térmica de células de *E. coli* O157:H7**

Células cultivadas de *E. coli* O157:H7 foram injetadas (1,5 ml) em tubo de rosca com tampa de borracha pré-aquecido em banhos a 42 e 45°C por 5 minutos. Imediatamente, 1 ml da suspensão celular foi removida e inoculada em frasco pré-aquecido, contendo 100 ml de meio TSYGB a 59°C durante 5 minutos, seguindo-se resfriamento em banho de gelo durante 1 minuto. Células não submetidas a choque térmico foram utilizadas como controle. Tanto as células submetidas ao choque térmico como as do controle, foram incubadas a 30°C em ambiente aeróbio (O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) e anaeróbio (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v) (item 3.7.1.).

### **3.13. Medição do potencial de óxido-redução e pH**

Mediu-se o potencial de óxido-redução dos meios de cultura TSYGB, preparados sob diferentes misturas gasosas (item 3.2.1.), dos meios preparados a base de alimentos sob condições de aerobiose e anaerobiose (item 3.2.2.) e em frascos contendo meio TSYGB inoculados com células de *E. coli* O157:H7. A medição do potencial de óxido-redução foi realizada utilizando-se eletrodo de platina (MI-800-410, Microelectrodes Inc., Estados Unidos) e pHmetro (modelo 520A, Orion Research, Reino Unido). Antes de se iniciar as medições, a resposta do eletrodo foi checada utilizando-se soluções tampão de quinidrina saturada pH 4 e 7 (FIGURA 3). A diferença entre a leitura do potencial de óxido-redução observada nos tampões de pH 4,0 e pH 7,0 deveria situar-se entre 170 e 175 mV. No caso de não se obter resposta dentro desta faixa, os eletrodos eram tratados com soluções de KOH/etanol e HNO<sub>3</sub> concentrado (FIGURA 4), e nova leitura era realizada.

Durante a medição do potencial de óxido-redução dos meios não inoculados com *E. coli* O157:H7, injetou-se o espaço-livre com gás aeróbio

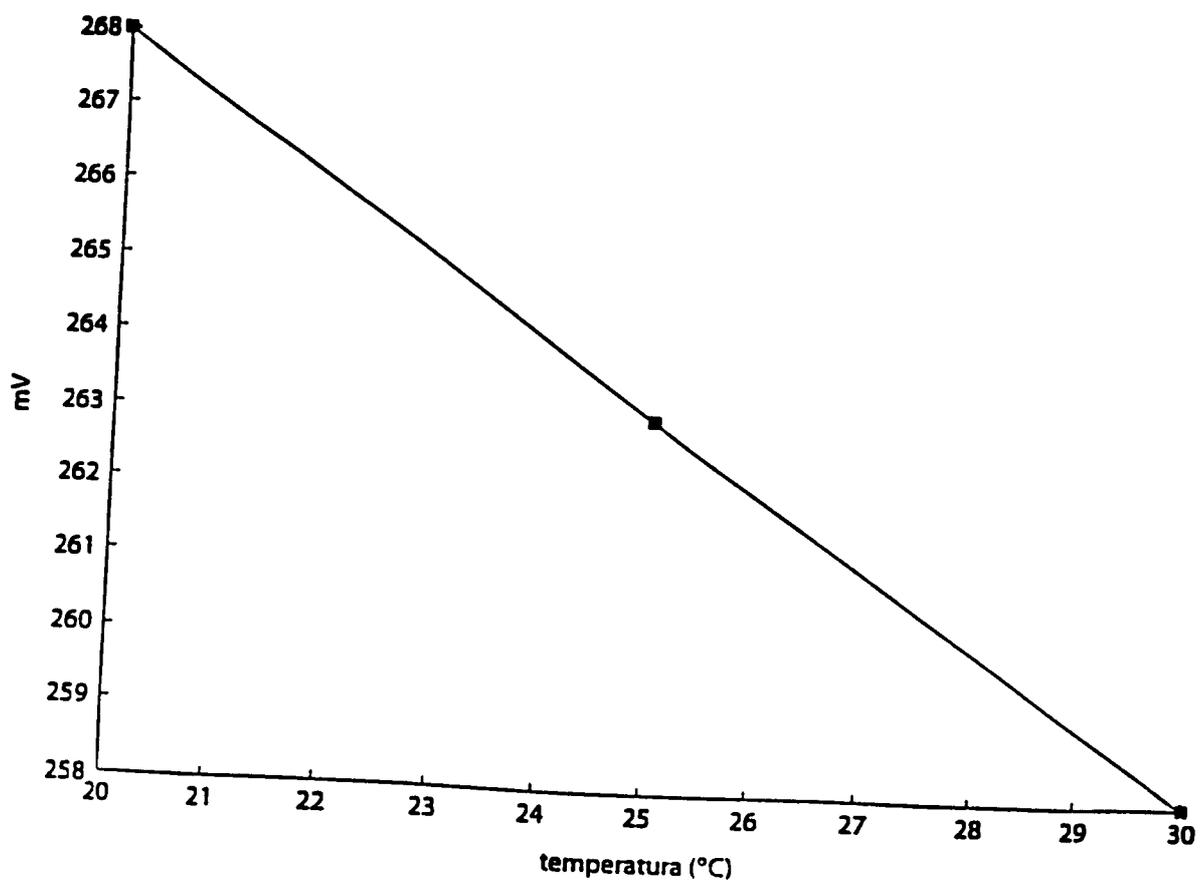


FIGURA 3. Variação do potencial de óxido-redução do tampão de quinidrina pH 4 em função da temperatura.

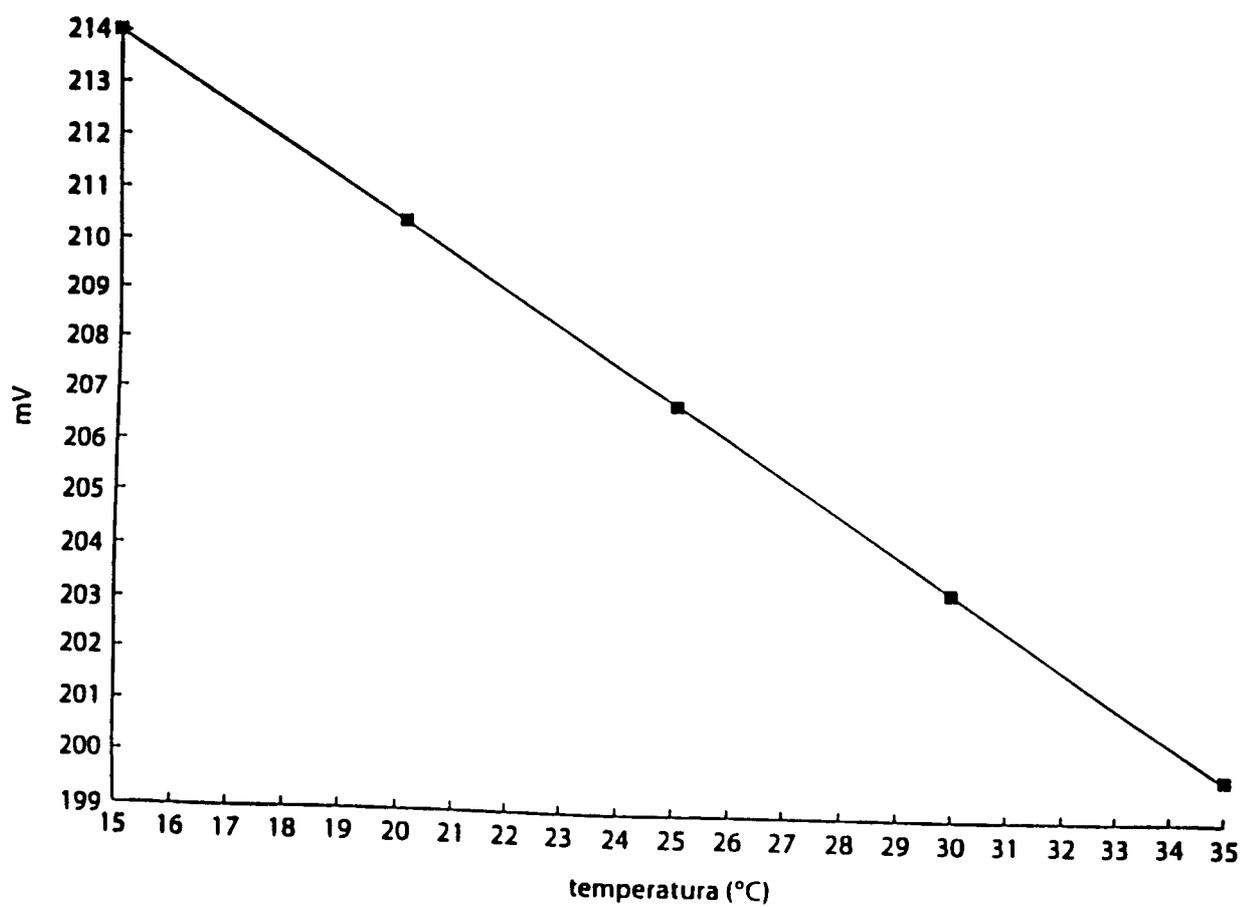


FIGURA 4. Variação do potencial padrão de óxido-redução do eletrodo de referência em função da temperatura.

(O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) ou anaeróbio (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v). O pH também foi medido sob fluxo de gás utilizando-se uma combinação de eletrodos (Hanna HI 1330 B, Jencons (Scientific) Ltd., Reino Unido), conectados ao pHmetro anteriormente citado. Os valores foram calculados pela média de três tubos de cada um dos meios de cultura ou de alimento, preparados sob cada atmosfera gasosa.

De modo a se determinar a existência de um gradiente de potencial de óxido-redução nos tubos contendo meios a base de alimentos em estado semi-sólido, as medições foram realizadas no topo e no fundo destes. Para a medição do potencial de óxido-redução no topo do tubo, a extremidade do eletrodo foi inserida 10 mm abaixo da superfície do alimento. O eletrodo foi inserido profundamente (60 a 80 mm abaixo da superfície) nos tubos contendo meios a base de alimentos, para a obtenção da medida do potencial de óxido-redução no fundo. O potencial de óxido-redução do meio a base de leite foi medido apenas na porção central do líquido.

Também foram realizadas medições do potencial de óxido-redução em frascos contendo 50 ml de meio TSYGB aeróbio (O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v), e 100 ml de meio TSYGB anaeróbio (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v), inoculados com suspensão de *E. coli* O157:H7 (0,5 e 1,0 ml, respectivamente), e submetidos a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos. Após o tratamento térmico, os frascos foram incubados em banho a temperatura de 30°C, e o potencial de óxido-redução foi monitorado simultaneamente, durante um período de 9 horas. Para o controle do espaço-livre dos frascos, inseriu-se o eletrodo através do septo de borracha do frasco, evitando-se a entrada de ar, mantendo-se assim, as condições originais de incubação. Foram também inoculados dois frascos contendo 5 ml de meio de enumeração aeróbio com 0,1 ml de suspensão celular não diluída, os quais foram incubados em banho a 30°C, com monitoramento simultâneo do potencial de óxido-redução durante 9 horas. Os valores de potencial de óxido-redução obtidos pelas medições dos

frascos inoculados com *E. coli* O157:H7 não foram corrigidos para pH, conforme previamente descrito.

Calculou-se os potenciais de óxido-redução de acordo com a equação de LEISTNER & MIRNA (1959):

$$E_h = E_{obs} + E_{ref} + E_N(pH_x - 7)$$

$E_{obs}$  = potencial de óxido-redução observado na amostra.

$E_{ref}$  = potencial de óxido-redução do eletrólito interno (3 M KCl Ag/AgCl) do eletrodo.

$E_N$  = potencial de Nernst, considerado 59 mV.

$pH_x$  = pH da amostra.

### **3.14. Medida da composição do espaço-livre dos meios**

#### **3.14.1. Em meio de cultura**

A composição do gás do espaço-livre dos frascos contendo meio TSYGB preparado sob diferentes misturas gasosas, foi medida através de cromatógrafo gasoso acoplado com detector de condutividade térmico (Pye UNICAM PU 4500). Este equipamento estava conectado com um integrador eletrônico (Pye UNICAM PU 4811), que registrava e analisava os picos. Foram analisadas amostras de gases de cinco tubos de meio TSYGB não inoculados, representando cada lote de meios preparados. As amostras gasosas foram retiradas dos frascos com auxílio de agulha hipodérmica e seringa "gas-tight" de 2 ml, com uma válvula de três vias acoplada. As

amostras foram analisadas em coluna de aço inox de 0.6 m x 4 mm de diâmetro interno, recheada com Porapak Q 80-100 mesh (Water Associates), conectada em série com segunda coluna de aço inox de 2,1 m x 4 mm de diâmetro interno, recheada com peneira 40-60 Molecular 5A (BDH). As colunas foram mantidas isotermicamente a 80°C, usando hélio como gás de arraste (vazão de 40 ml/min).

### **3.14.2. Em meio a base de alimentos**

A composição do gás do espaço-livre dos tubos a base de alimentos, foi obtida de modo a se determinar os níveis de oxigênio que permaneceram no espaço-livre, após a esterilização a 121°C por 15 minutos, diferenciando tubos aeróbios e anaeróbios. A medição foi realizada em cinco tubos de cada alimento, preparados sob misturas gasosas em aerobiose ( $O_2/N_2$ , 20:80 v/v) e anaerobiose ( $H_2/N_2$ , 10:90 v/v), utilizando-se um medidor de oxigênio portátil (Portamap 1, Systech Instruments, Reino Unido).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Curva de crescimento de *E. coli* O157:H7 sob condições aeróbias e anaeróbias

De acordo com BEUCHAT & LECHOWICH (1968), células bacterianas em fase de crescimento estacionário são mais resistentes ao tratamento térmico. Dessa forma, determinou-se o tempo necessário para *E. coli* O157:H7 alcançar esta fase de crescimento, incubando-a em condições de aerobiose (em meio TSYGB preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) e anaerobiose (em meio TSYGB preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v), a 30°C. De acordo com a FIGURA 5, as células de *E. coli* O157:H7, tanto em condições de aerobiose como anaerobiose, concluíram a fase de crescimento logarítmico em 14 horas, entrando a seguir, na fase estacionária de crescimento, a qual se mantém pelo menos até 25 horas. Observou-se que as misturas gasosas testadas não alteraram o crescimento de *E. coli* O157:H7, uma vez que obteve-se curvas de crescimento similares sob as duas condições. A partir das curvas obtidas, determinou-se o tempo de incubação de 24 horas a 30°C, para a obtenção de células de *E. coli* O157:H7 em fase estacionária de crescimento.

### 4.2. Determinação do tempo necessário para o aquecimento e resfriamento dos meios de tratamento térmico

Determinou-se o tempo necessário para o pré-aquecimento e resfriamento do meio TSYGB contido em tubos e frascos, os quais foram utilizados nos tratamentos térmicos de *E. coli* O157:H7. As FIGURAS 6 e 7 mostram os tempos necessários para que a temperatura do meio TSYGB contido em tubos e frascos se iguale a do banho (a 59°C). O tempo necessário para que 10 ml de meio contido nos tubos atingisse a temperatura do banho foi de 2,7 minutos, enquanto que, para os 100 ml de meio contido no frasco, foram necessários aproximadamente 10 minutos. Quando o frasco contendo meio TSYGB atingiu a temperatura do banho, este foi imerso em banho de gelo, de modo a determinar-se o tempo necessário para seu resfriamento (atingindo a temperatura de 30°C). O meio

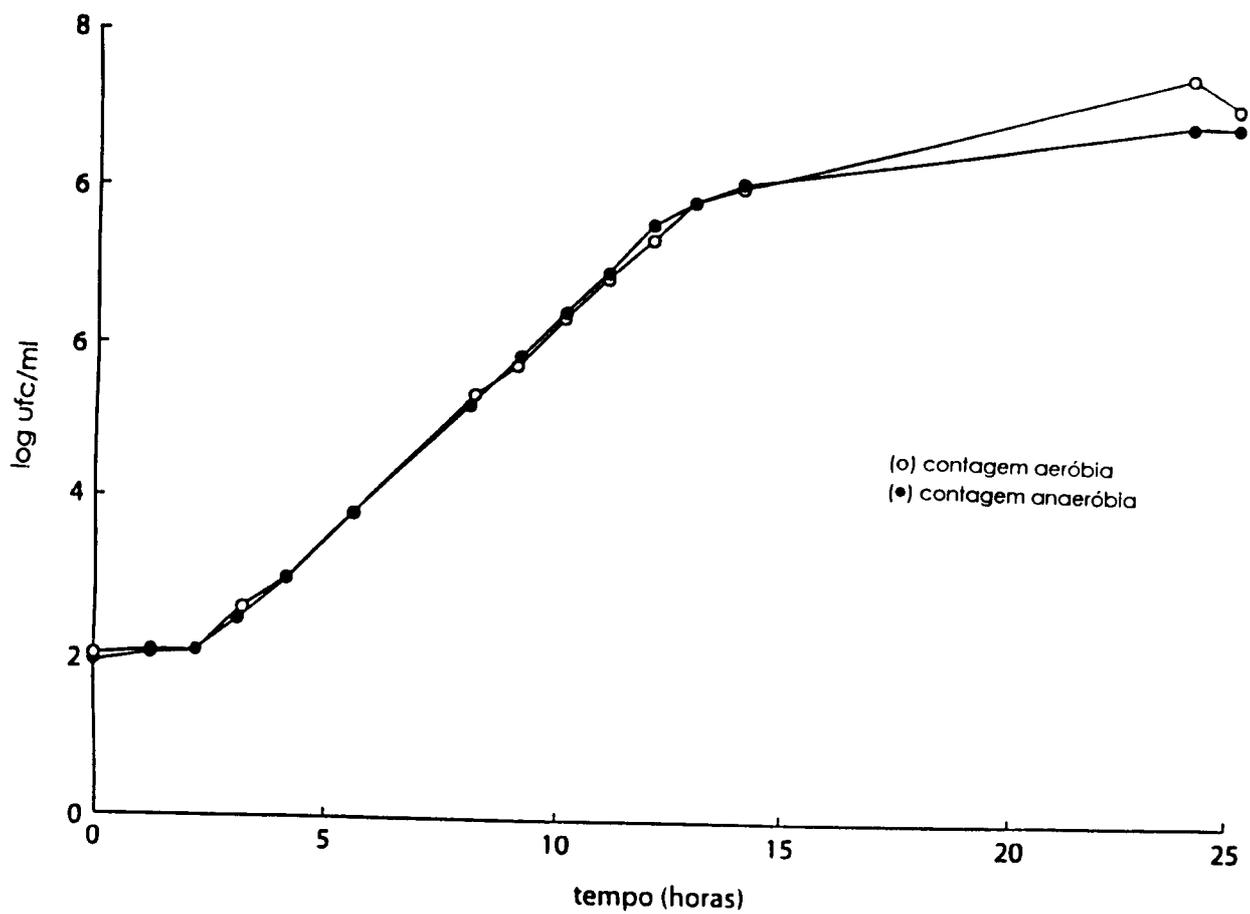


FIGURA 5. Curva de crescimento de *E. coli* O157:H7 sob condições aeróbias e anaeróbias e incubação a 30°C.

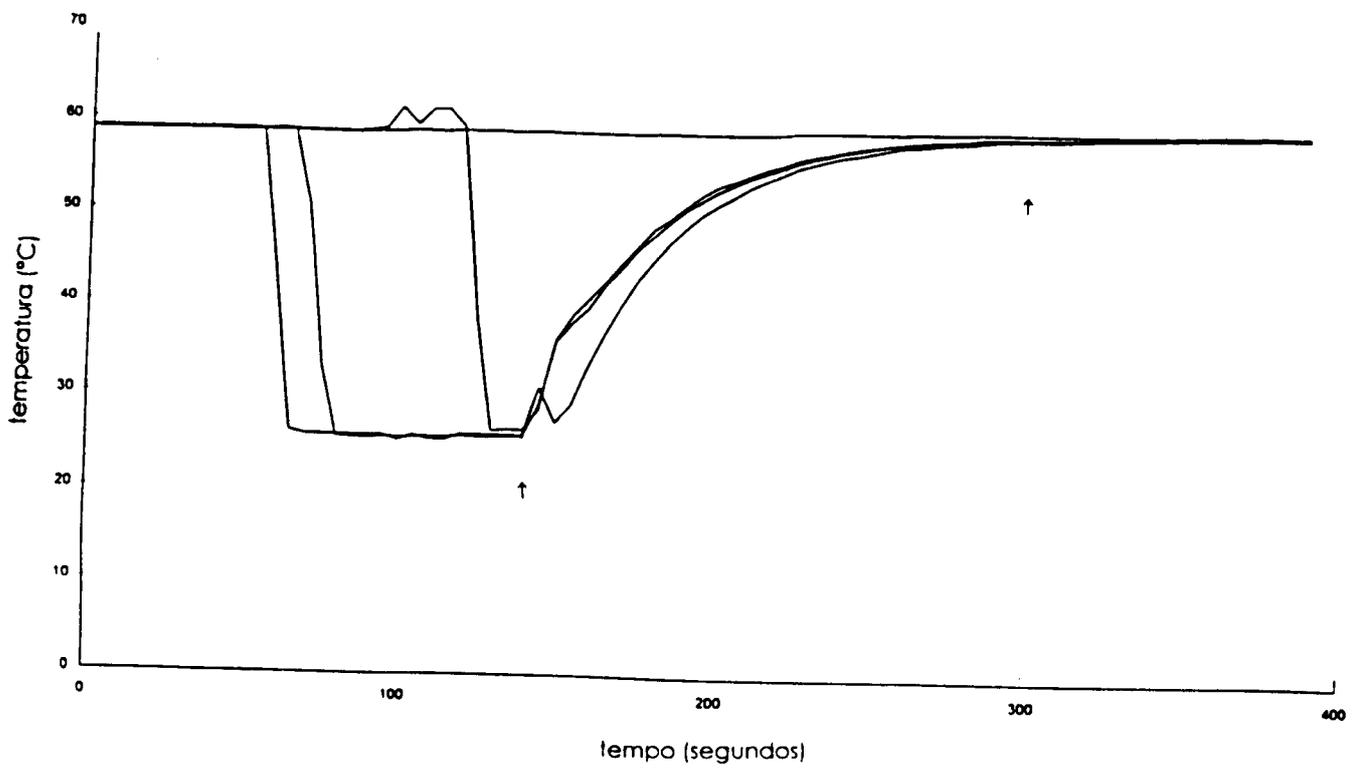


FIGURA 6. Tempo necessário para que 10 ml de meio TSYGB contido em tubo atinja a temperatura de equilíbrio de 59°C.

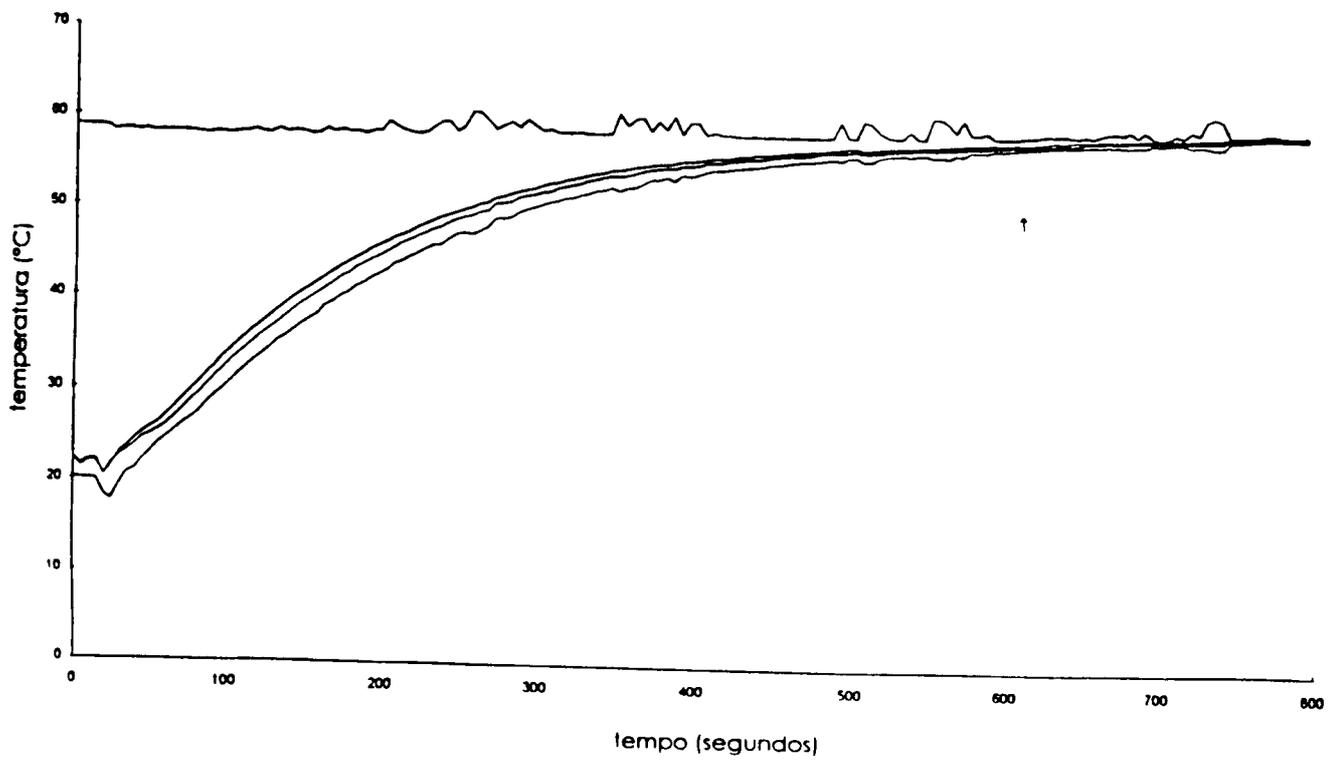


FIGURA 7. Tempo necessário para que 100 ml de meio TSYGB contido em frasco atinja a temperatura de equilíbrio de 59°C.

TSYGB contido no tubo foi resfriado durante aproximadamente 20 segundos (FIGURA 8), e o meio contido no frasco foi resfriado após 50 a 60 segundos (FIGURA 9). Assim, tomou-se o cuidado de se pré-aquecer e resfriar os tubos e frascos contendo meio TSYGB a serem utilizados para tratamento térmico, dentro da faixa de tempo obtida.

Para se avaliar se o volume de suspensão bacteriana a ser submetido a tratamento térmico causa alteração na temperatura do meio pré-aquecido, tubos e frascos contendo 10 e 100 ml de meio TSYGB foram inoculados respectivamente com 0,1 e 1 ml, de suspensão *E. coli* O157:H7 contendo  $10^{11}$  células/ml. Foi verificado que o volume de suspensão celular inoculado no tubo (FIGURA 10) e no frasco (FIGURA 11) não causam oscilações significativas de temperatura no meio de tratamento térmico. Assegurou-se, dessa forma, a precisão das temperaturas empregadas para os tratamentos térmicos, evitando-se interferências da temperatura dos meios de cultura na temperatura de referência.

#### **4.3. Determinação das condições de tratamento térmico para células de *E. coli* O157:H7**

Determinou-se os tempos requeridos para o tratamento térmico de células de *E. coli* O157:H7 sob anaerobiose (em meio TSYGB preparado sob  $H_2/N_2$ , 10:90 v/v), às temperaturas de 55, 59 e 61°C. Para isso, foram selecionados tempos que resultassem na redução de 3 a 4 ciclos log na contagem realizada sob condição anaeróbia (em meio TSYGB preparado sob  $H_2/N_2$ , 10:90 v/v), e redução de 5 a 6 ciclos log na contagem aeróbia (em meio TSYGB preparado sob  $O_2/N_2$ , 20:80 v/v), obtendo-se uma diferença de cerca de 3 ciclos log entre ambas as contagens. A partir das curvas de inativação térmica, selecionou-se os seguintes tempos de tratamentos térmicos: 100 minutos a 55°C (FIGURA 12a); 5 minutos a 59°C (FIGURA 12b) e 1 minuto a 61°C (FIGURA 12c).

Dessa forma, foram estabelecidos tratamentos térmicos brandos que resultassem na obtenção de suspensão contendo células mortas (letalmente ou irreversivelmente injuriadas), injuriadas (subletalmente ou reversivelmente injuriadas) e células normais (não injuriadas), sendo que esses dois últimos grupos compreendem os

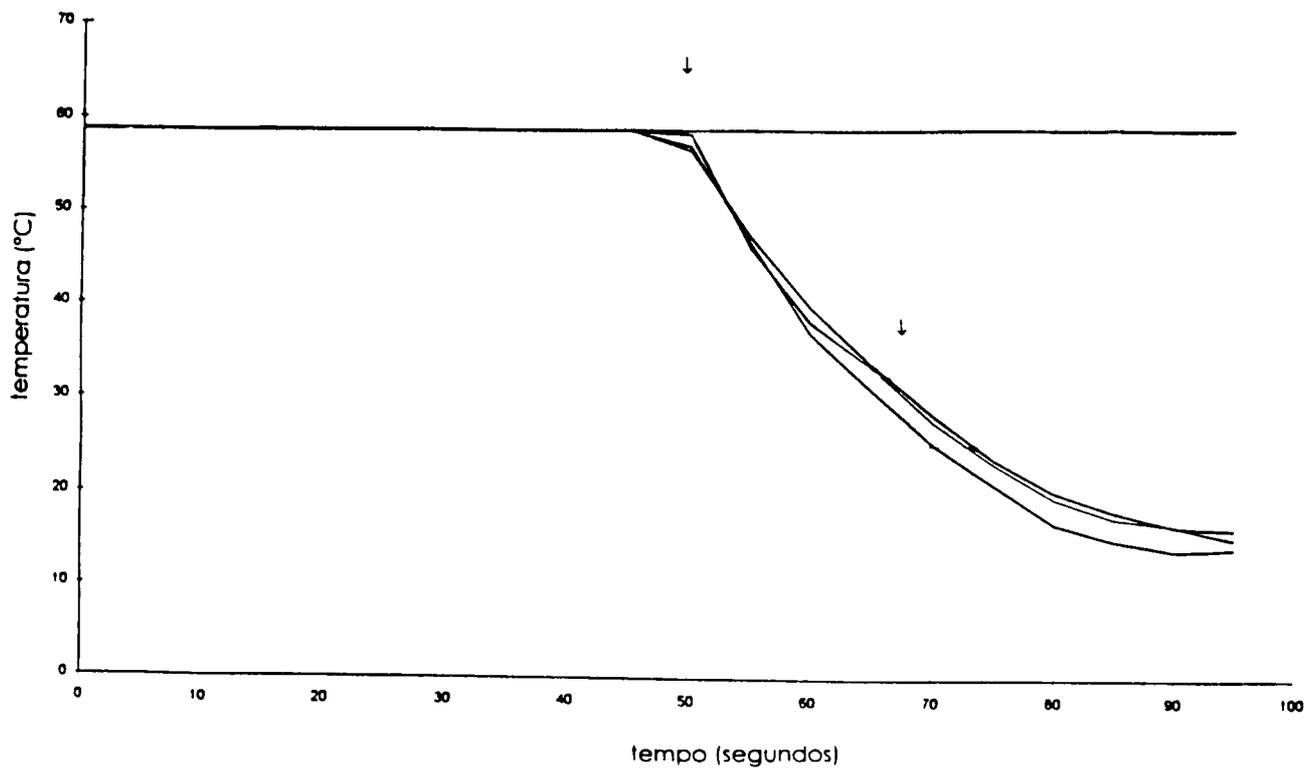


FIGURA 8. Tempo necessário para que 10 ml de meio TSYGB contido em tubo atinja a temperatura de resfriamento de 30°C.

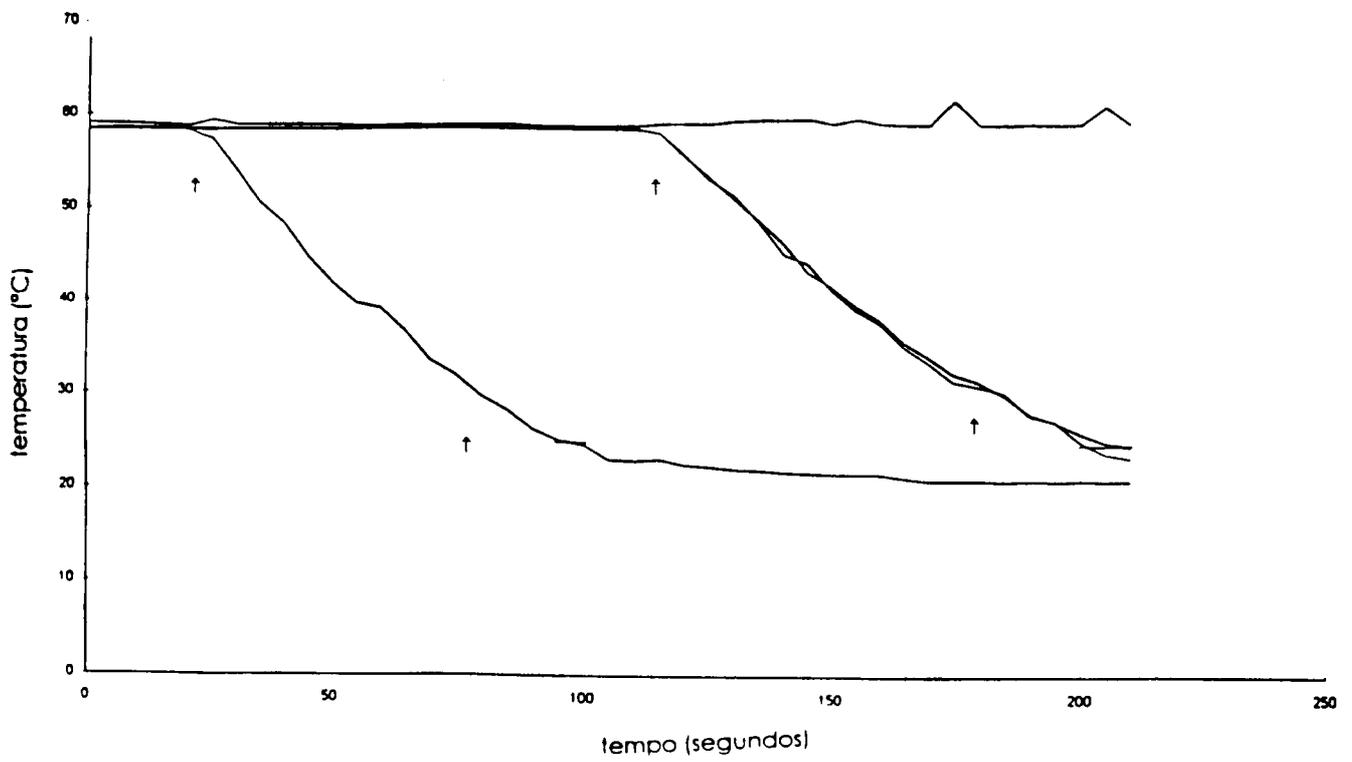


FIGURA 9. Tempo necessário para que 100 ml de meio TSYGB contido em frasco atinja a temperatura de resfriamento de 30°C.

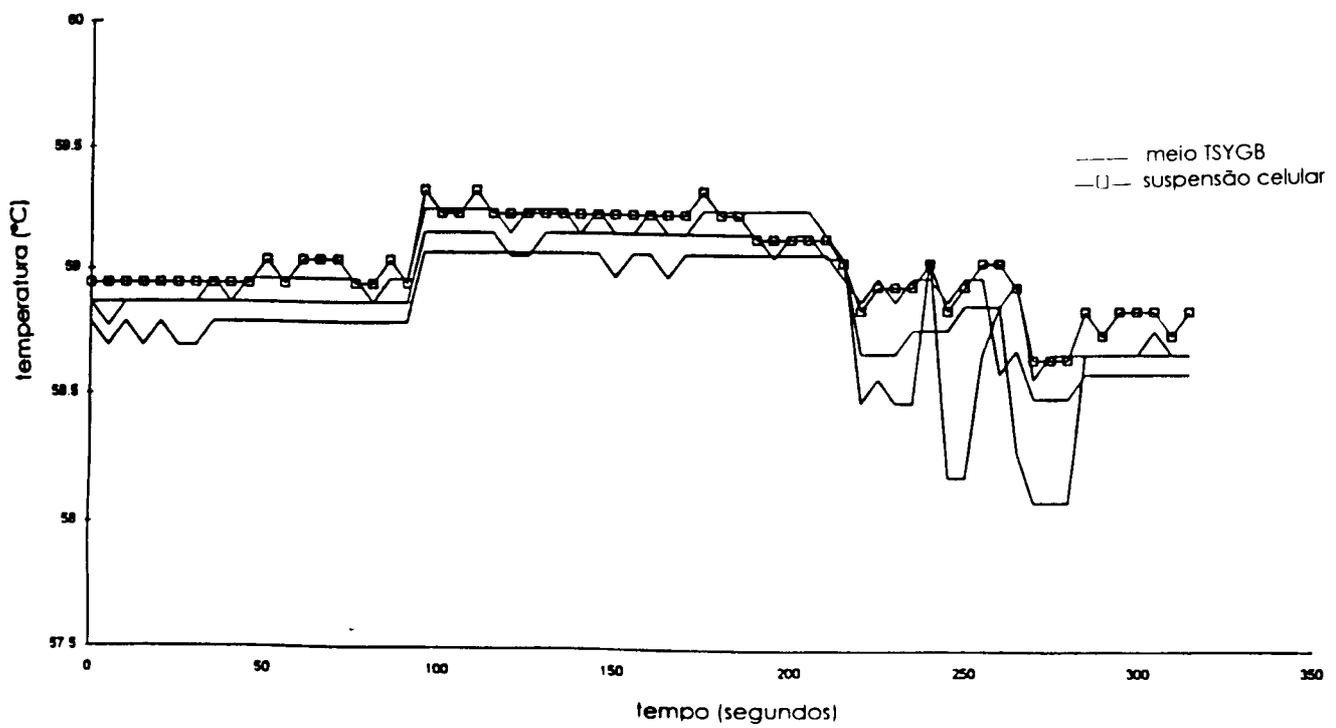


FIGURA 10. Efeito da inoculação de 0,1 ml de suspensão de *E. coli* O157:H7 na temperatura de 10 ml de meio TSYGB pré-aquecido a 59°C.

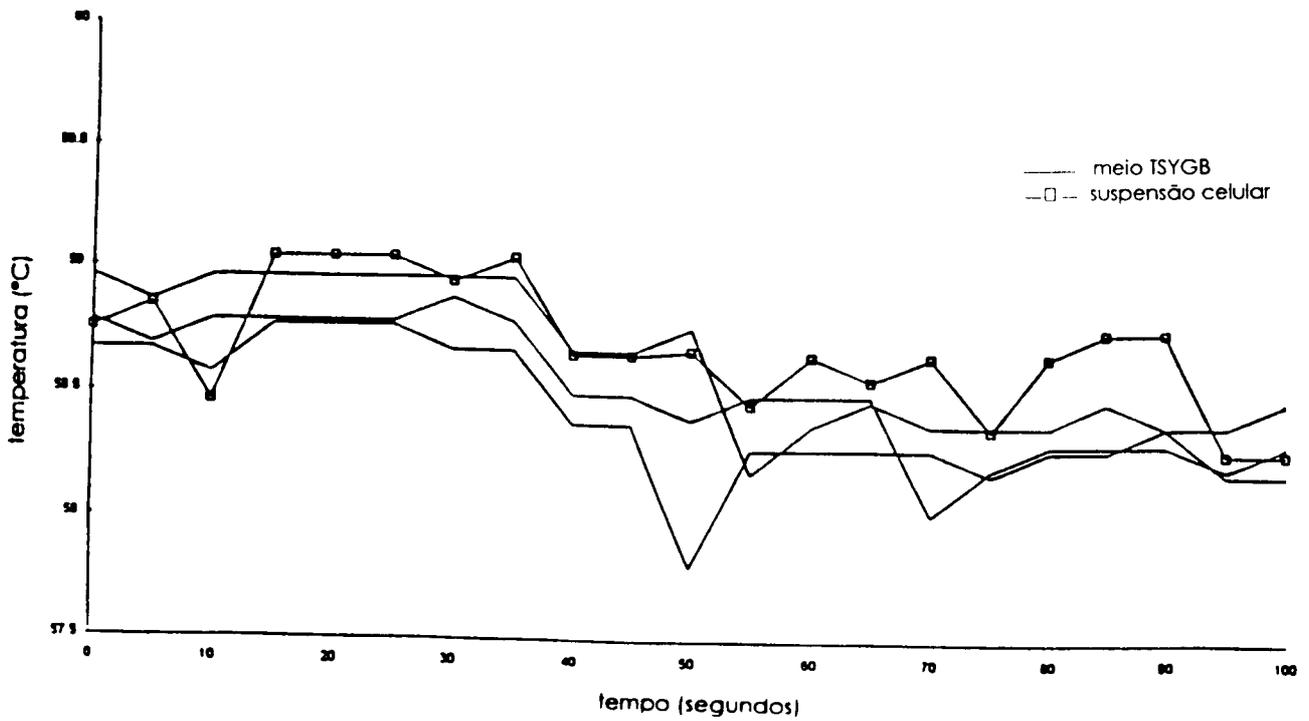


FIGURA 11. Efeito da inoculação de 1 ml de suspensão de *E. coli* O157:H7 na temperatura de 100 ml de meio TSYGB pré-aquecido a 59°C.

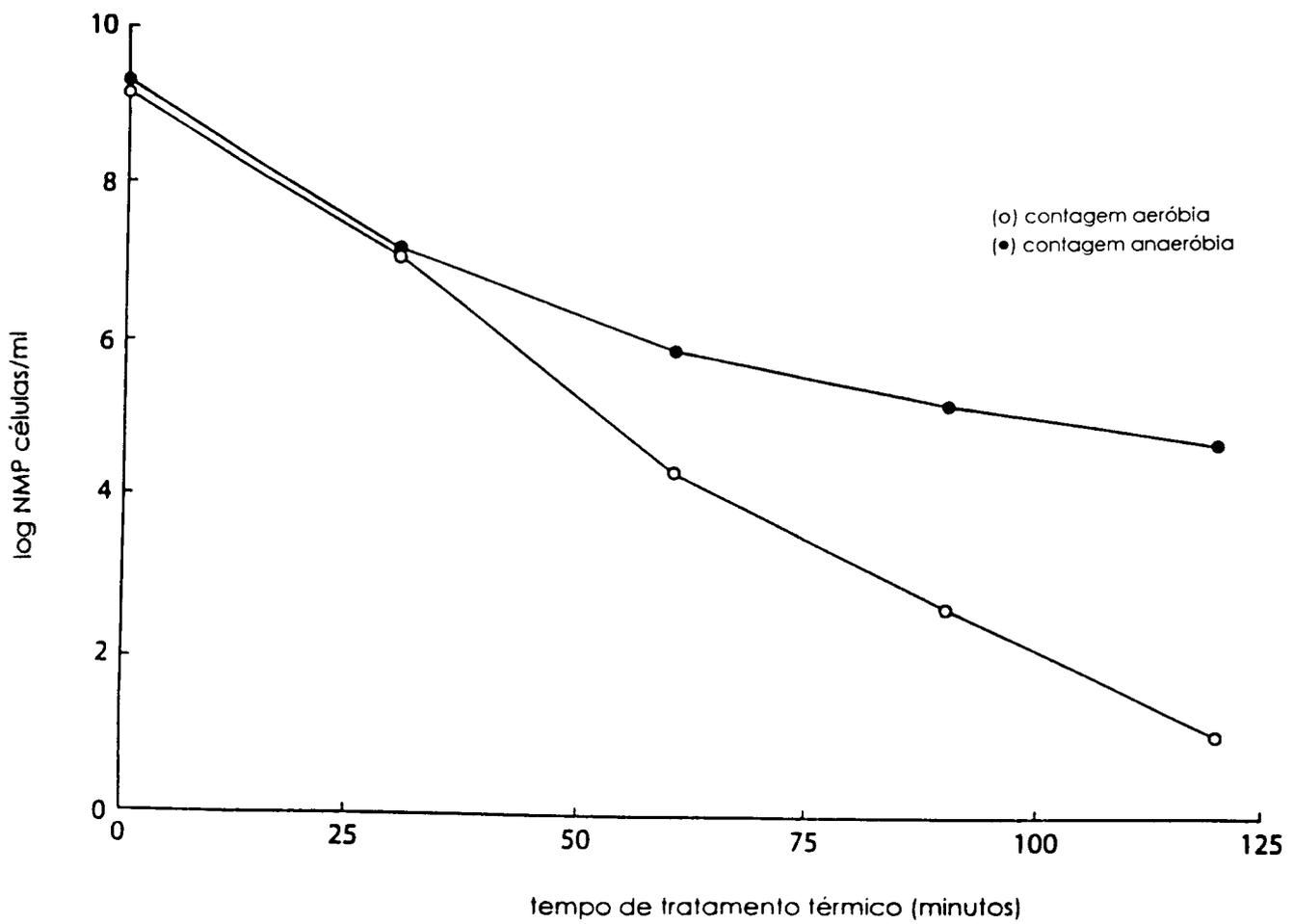


FIGURA 12a. Curva de inativação térmica de *E. coli* O157:H7 a temperatura de 55°C.

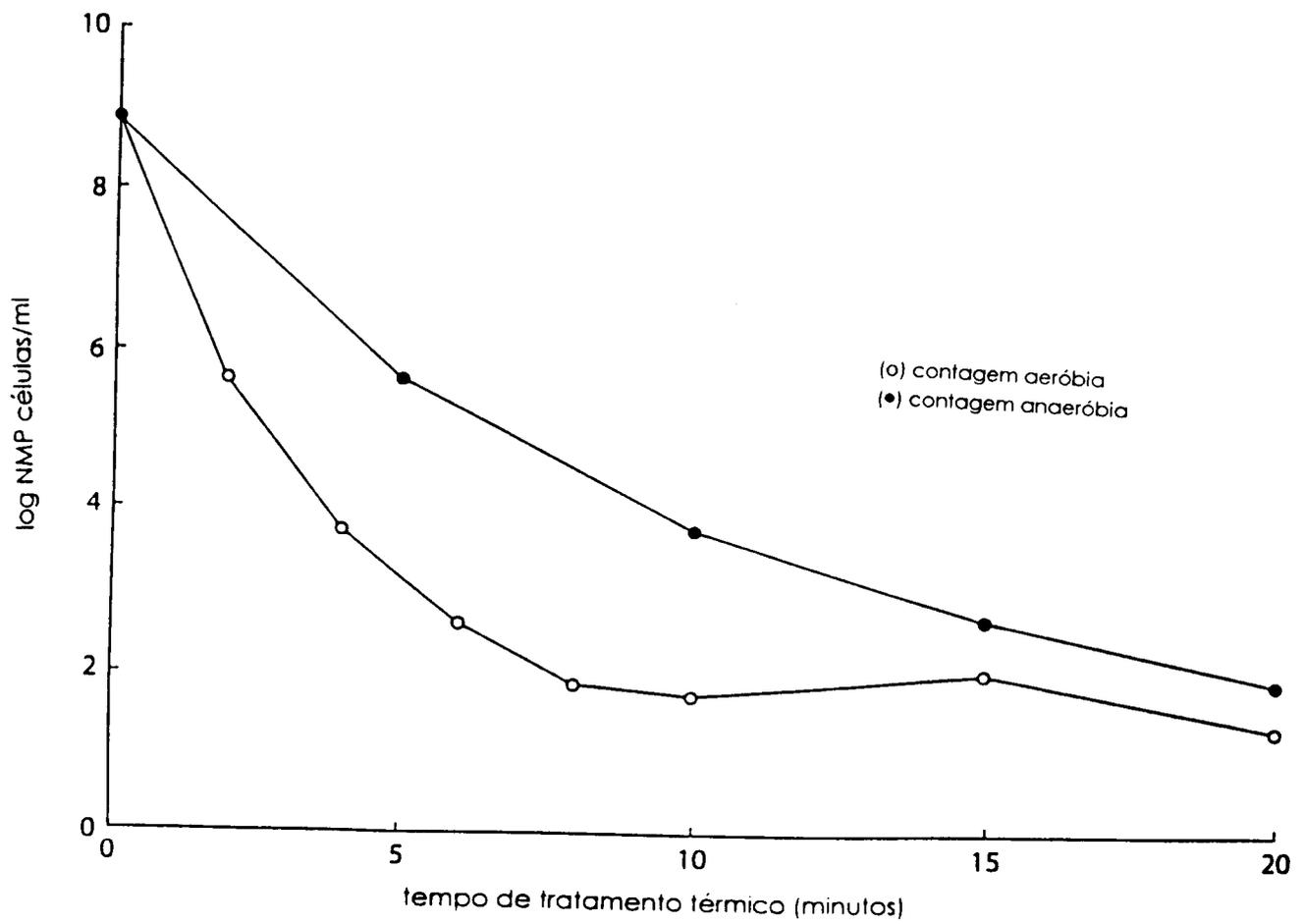


FIGURA 12b. Curva de inativação térmica de *E. coli* O157:H7 a temperatura de 59°C.

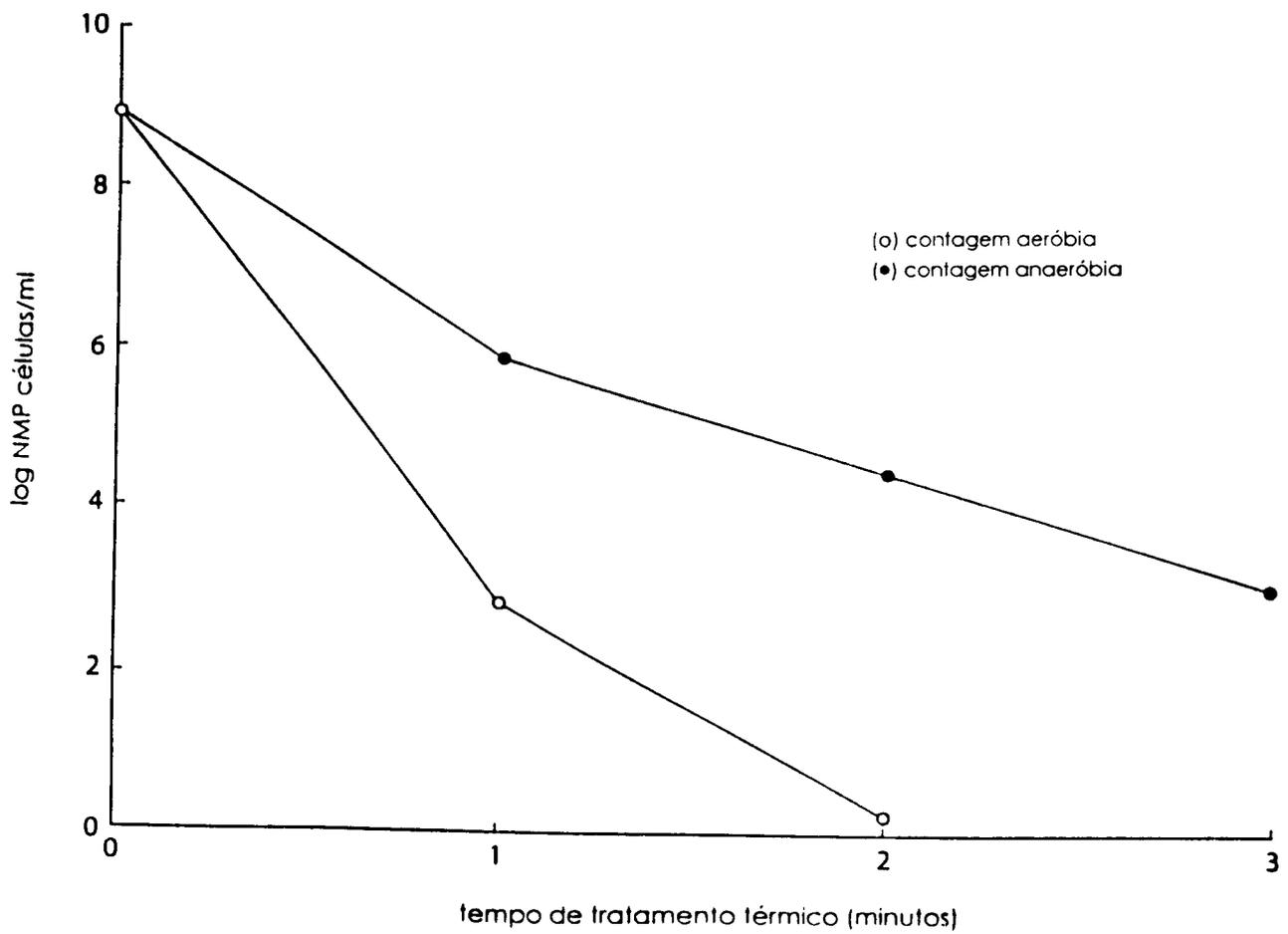


FIGURA 12c. Curva de inativação térmica de *E. coli* O157:H7 a temperatura de 61°C.

sobreviventes.

Muitos componentes estruturais e funcionais da bactéria são afetados pelo calor, incluindo-se a parede celular, membrana citoplásmica, ribossomos, DNA e muitas enzimas (RAY, 1993). Como as células injuriadas contidas nessa suspensão foram recuperadas sob condições mais favoráveis (meio sob anaerobiose) e também sob condições em que havia um fator de estresse celular (meio sob aerobiose), obteve-se a diferença de cerca de 3 ciclos log entre as contagens aeróbia e anaeróbia. Portanto, a exposição ao oxigênio de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas por tratamento térmico, constituiu-se num fator de estresse para estas células, conforme demonstrado pelo menor número de células recuperadas nestas condições.

#### **4.4. Efeito do cultivo, tratamento térmico e incubação em condição de anaerobiose na recuperação de *E. coli* O157:H7**

As células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas, tratadas termicamente a 59°C durante 5 minutos em anaerobiose (em meio TSYGB preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v), resfriadas, e o número de sobreviventes foi enumerado sob condições aeróbia (meio TSYGB preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) e anaeróbia (em meio TSYGB preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v). A enumeração foi realizada em intervalos de tempo durante 24 horas, sendo que a suspensão celular submetida a tratamento térmico foi incubada a 30°C. O número de células com habilidade para crescer sob condições anaeróbias era de cerca de 10<sup>6</sup> células/ml, comparado a aproximadamente 10<sup>3</sup> células/ml capazes de crescer em aerobiose (FIGURA 13). Isto resulta numa redução decimal de 3-D e de 6-D, no número de células de *E. coli* O157:H7 enumeradas em condições anaeróbia e aeróbia, respectivamente. Sugere-se então, que imediatamente após o tratamento térmico, 99,9% das células sobreviventes apresentavam sensibilidade ao oxigênio. Quando o frasco contendo a suspensão de *E. coli* O157:H7 submetida ao tratamento térmico foi incubado em anaerobiose a 30°C, as células sensíveis ao oxigênio gradualmente perderam sua sensibilidade e puderam crescer na presença desse elemento, conforme indicado pelo aumento da contagem aeróbia. Após aproximadamente 6 horas, todas as células recuperaram sua resistência ao oxigênio, apresentando então, a mesma contagem tanto

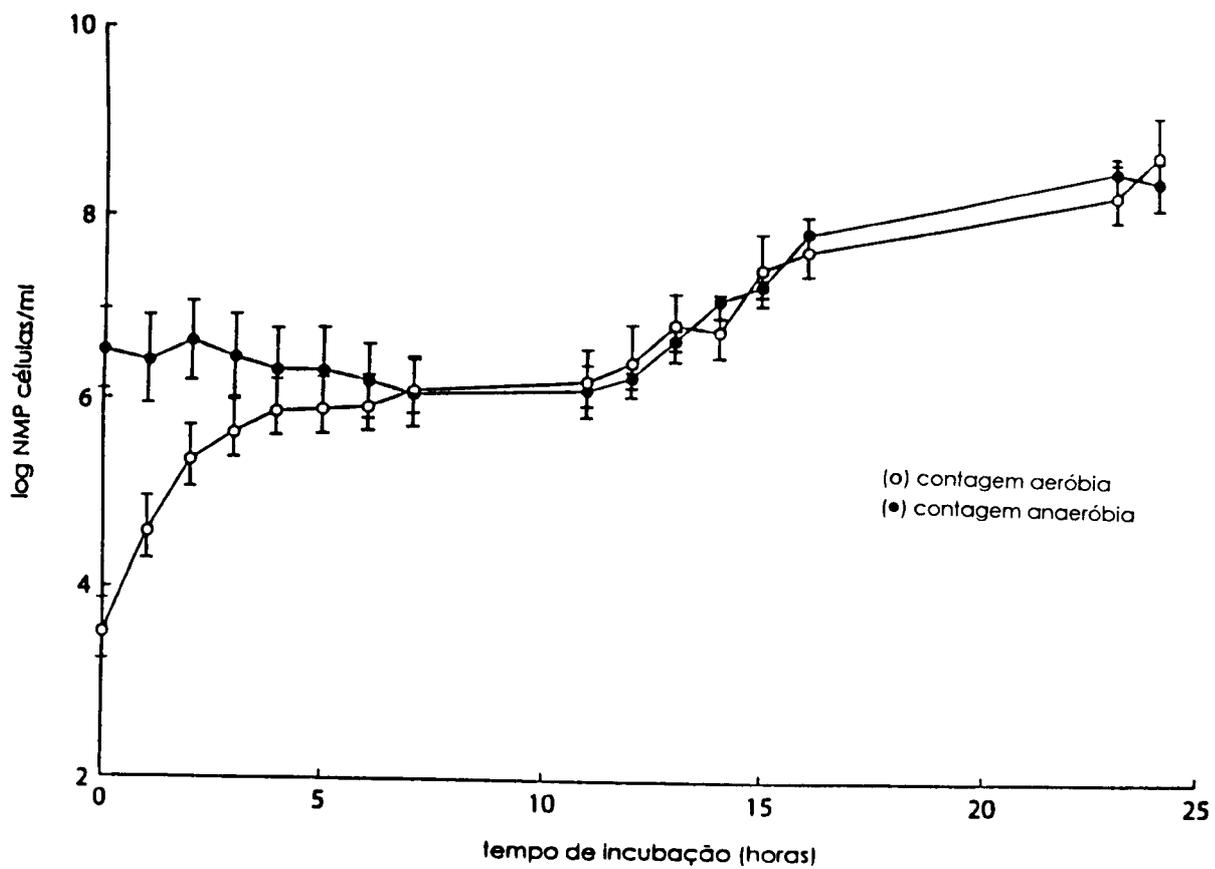


FIGURA 13. Efeito da incubação em anaerobiose a 30°C de células de *E. coli* O157:H7, submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos, e enumeradas em meio aeróbio e anaeróbio.

em condição aeróbia como anaeróbia. A contagem anaeróbia permaneceu constante durante as 6 horas subseqüentes ao tratamento térmico, que correspondem ao período em que as células de *E. coli* O157:H7 recuperam sua tolerância ao oxigênio. As contagens em meio preparado sob aerobiose e anaerobiose aumentaram, até apresentarem a mesma taxa de crescimento, atingindo a fase estacionária com  $10^8$  a  $10^9$  células/ml.

#### **4.5. Efeito do cultivo, tratamento térmico e incubação sob condições aeróbias, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7**

Células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas, submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos, resfriadas e incubadas a 30°C, sob condições de aerobiose (meio TSYGB preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v). A enumeração foi realizada em intervalos de tempo, em condições aeróbia (meio TSYGB preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) e anaeróbia (meio TSYGB preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v), durante 33,5 horas. De acordo com a FIGURA 14, o número de células enumeradas em meio anaeróbio no tempo zero, foi 1 log inferior ao apresentado na FIGURA 13, onde *E. coli* O157:H7 foi cultivada, submetida a tratamento térmico e incubada em condição de anaerobiose. Isto sugere, que as células cultivadas e tratadas termicamente sob condições aeróbias são mais sensíveis ao calor, do que as células cultivadas e tratadas termicamente sob condições anaeróbias. As células recuperaram sua habilidade de crescer em presença de oxigênio, o que foi verificado pelo aumento da contagem em condição aeróbia, que ocorreu ao mesmo nível da contagem realizada em anaerobiose. As células incubadas em aerobiose se recuperaram após cerca de 9 horas, quando então, a contagem aeróbia se igualou a anaeróbia. Após um aumento no número de células, as contagens em aerobiose e anaerobiose, apresentaram então, a mesma taxa de crescimento, atingindo a fase estacionária com  $10^8$  a  $10^9$  células/ml.

As células incubadas em condições de aerobiose se recuperaram apenas um pouco mais devagar (9 horas, FIGURA 14) do que as células incubadas em anaerobiose (6 horas, FIGURA 13). Contudo, o padrão de recuperação foi diferente. Na incubação sob condição anaeróbia (FIGURA 13), o número de células recuperadas aumentou cerca de 3

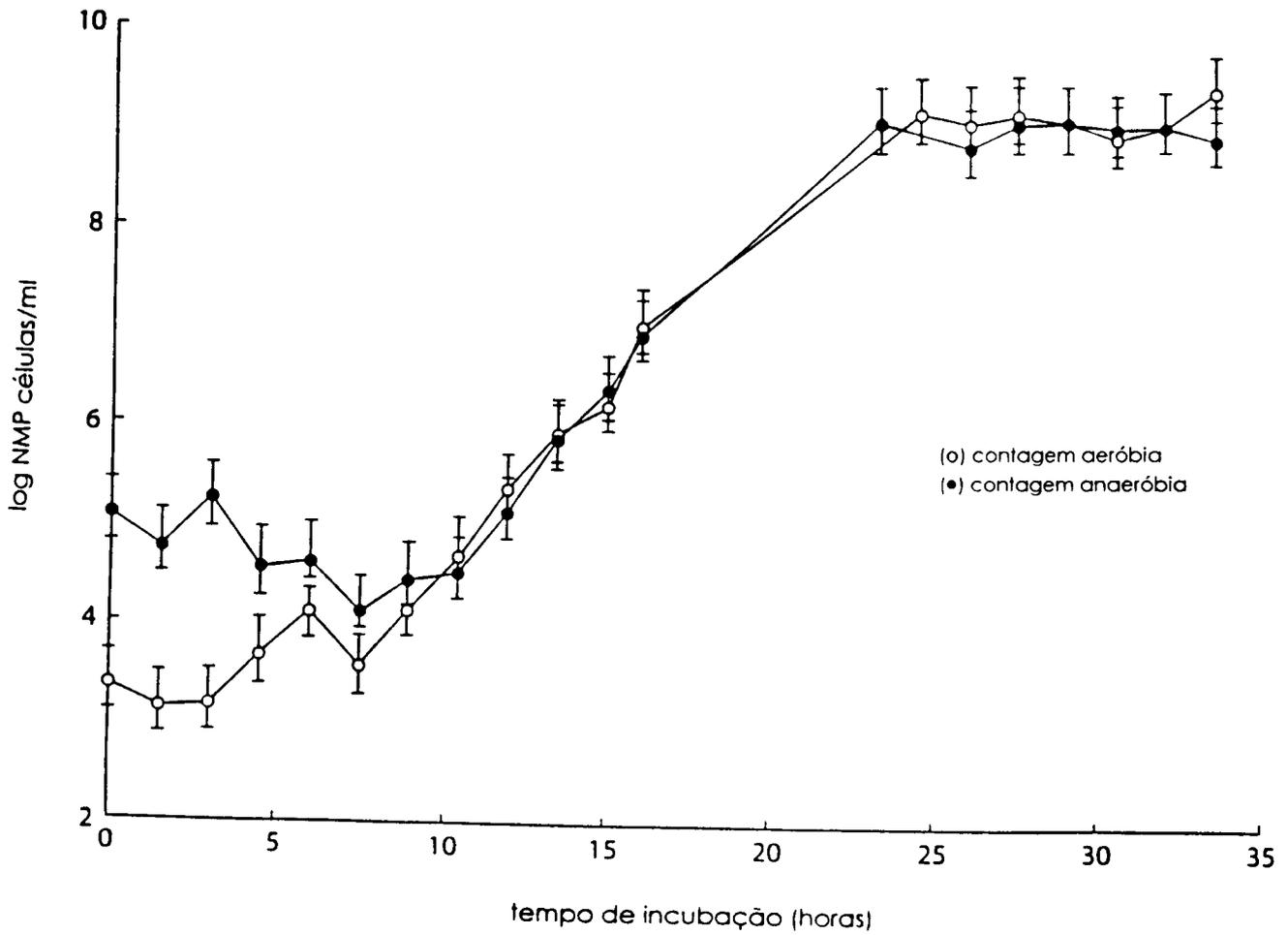


FIGURA 14. Efeito da incubação em aerobiose a 30°C de células de *E. coli* O157:H7, submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos, e enumeradas em meio aeróbio e anaeróbio.

ciclos log nas primeiras 2 horas, seguido pelo aumento de 1 ciclo log nas 4 horas seguintes. Quando as células foram incubadas em aerobiose (FIGURA 14), não ocorreu um aumento no número de células nas 4 horas iniciais, porém, nas 6 horas seguintes houve um aumento de 3 ciclos log. Durante este período, as células metabolicamente ativas removeram o oxigênio do meio aeróbio e reduziram o potencial de óxido-redução (FIGURA 15), permitindo então, sua recuperação sob condições anaeróbias (reduzidas). O potencial de óxido-redução do meio de enumeração (5 ml de meio TSYGB) permaneceu constante (cerca de 260 mV), não ocorrendo a recuperação da habilidade dessas células de crescerem em presença de oxigênio (FIGURA 15).

Não se esperava obter uma recuperação rápida das células submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de aerobiose (meio TSYGB preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v), uma vez que, as células não se recuperaram no meio de contagem aeróbio durante o período de incubação de uma semana a 30°C.

Observamos que imediatamente após um tratamento térmico brando, pode ocorrer a não detecção de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas e expostas ao oxigênio. Portanto, se a eficiência de um tratamento térmico for avaliada apenas por métodos aeróbios de detecção de microrganismos, existe a possibilidade de que o alimento contenha células de *E. coli* O157:H7 injuriadas subletalmente, o que leva a resultados subestimados. Neste caso, este alimento pode ser considerado próprio para consumo, de acordo com a margem de segurança permitida.

#### **4.6. Monitoramento do potencial de óxido-redução de meios contendo células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico**

O potencial de óxido-redução dos meios de tratamento térmico e enumeração, inoculados com células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico a 59°C durante 5 minutos, estão apresentados na FIGURA 15. Foram verificados o potencial de óxido-redução em frascos contendo 5 e 50 ml de meio TSYGB aeróbio (preparado sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 v/v) e 100 ml de meio TSYGB anaeróbio (preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v), inoculados, respectivamente, com 0,1; 0,5; e 1 ml de suspensão celular de *E. coli*

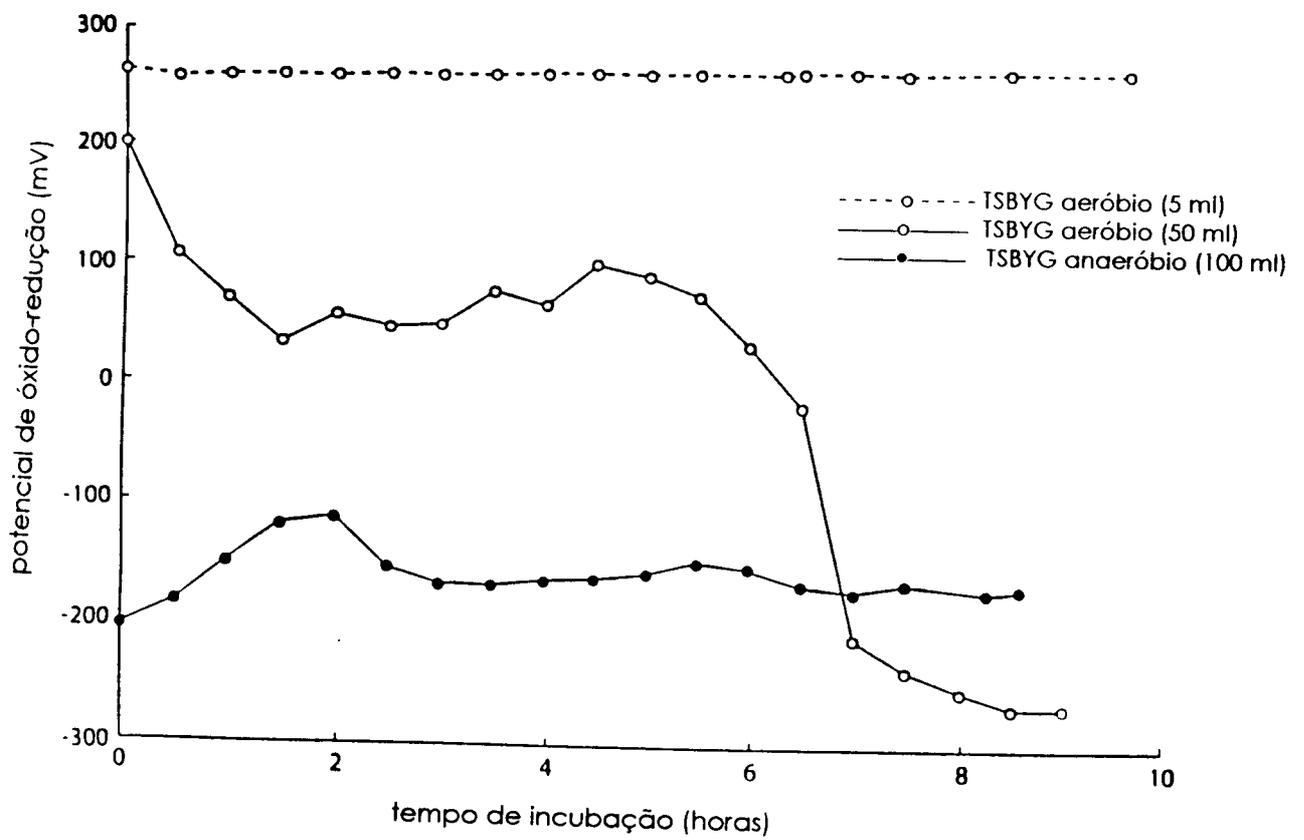


FIGURA 15. Variação no potencial de óxido-redução da cultura de *E. coli* O157:H7 incubada a 30°C.

O157:H7 submetida a tratamento térmico, e incubada a 30°C. O potencial de óxido-redução do frasco contendo 5 ml de meio de enumeração aeróbio e inoculado com a suspensão celular tratada termicamente, permaneceu constante ao redor de +260 mV durante 9 horas. No frasco contendo 100 ml de meio anaeróbio, o potencial de óxido-redução apresentou um aumento inicial de -200 a -100 mV, e então, permaneceu constante a -170 mV. Contudo, o frasco contendo 50 ml de meio de incubação preparado em aerobiose, apresentou uma queda de aproximadamente +200 mV nas duas horas iniciais, mantendo-se nesse nível por 4 horas, antes de nova queda atingindo aproximadamente -300 mV após cerca de 8 horas, com manutenção da leitura sob este nível.

Embora tentou-se assegurar que as condições fossem realmente aeróbias no meio preparado em aerobiose e submetido a tratamento térmico, através do uso de apenas 50 ml de meio num frasco de 125 ml (obtendo-se então um maior espaço-livre), o monitoramento do potencial de óxido-redução nas primeiras 9 horas do período de incubação deste meio demonstraram que, inicialmente o meio se apresentava aeróbio ( $E_h = +200$  mV), porém, este foi rapidamente reduzido, sendo que, após 2 horas variava entre +50 mV e +100mV. Este potencial de óxido-redução é similar ao do meio TSYGB preparado sob 1%  $O_2$  (47,49 mV, TABELA 2). A queda verificada na leitura do potencial de óxido-redução pode ser explicada pela presença de um grande número de células ou de material celular. Inicialmente, o nível apresentado era de  $10^9$  células/ml e, embora apenas  $10^5$  (0,01%) dessas células fossem capazes de se multiplicar, talvez apenas a presença do material celular por si só, pode ter sido suficiente para causar uma redução no potencial de óxido-redução. Foi demonstrado que Oxyrase™, um produto comercial (Oxyrase, Inc., EUA), que é constituído por membranas celulares de *E. coli*, reduz o potencial de óxido-redução do meio aeróbio ou mantém o potencial de óxido-redução baixo comparado ao controle (PHEBUS et al., 1993). Neste trabalho, o potencial de óxido-redução inicial, tanto de BHI (caldo brain heart infusion), como de BHI + Oxyrase™, era de -44 mV. Após 18 horas, o potencial de óxido-redução do controle se elevou a +34 mV, enquanto que na presença de Oxyrase™, o potencial de óxido-redução se manteve a apenas -26 mV.

Tabela 2. Valores do potencial de óxido-redução e de pH de meio TSYGB preparado sob diferentes misturas gasosas.

MEIO	POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO (mV)	pH
*TSYGB H <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 10:90	-335,44	6,41
TSYGB H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 10:50:40	-211,98	6,66
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 0,5:99,5	28,95	6,53
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 1:99	47,49	6,55
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 2:98	113,49	6,53
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 5:95	255,45	6,46
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 20:80	285,71	6,46
TSYGB O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 20:50:30	328,15	6,55

\* TSYGB - caldo triptona de soja acrescido de 0,3% de extrato de levedura e 1% de glicose

Esta queda no potencial de óxido-redução não ocorre no mesmo período de tempo no meio de enumeração aeróbio (em frasco contendo 5 ml de meio TSYGB). Isto pôde ser verificado, uma vez que, mesmo em frascos inoculados com amostra não diluída de *E. coli* O157:H7 submetida a tratamento térmico a 59°C, existe um fator de diluição de 1 para 50 (0,1 ml da suspensão em 5 ml de meio), de modo que a concentração celular total é de apenas  $2 \times 10^7$  células/ml. Os resultados mostram que o potencial de óxido-redução permanece constante ao redor de +260 mV durante as 9 horas de observação. Isto sugere que as células não crescem nas primeiras 6 horas, o que é indicado pela não detecção de aumento no número total de células na contagem aeróbia. Porém, talvez o simples metabolismo, e não a multiplicação celular, seja suficiente para reduzir o potencial de óxido-redução. De acordo com JACOB (1970), o potencial de óxido-redução medido durante o cultivo de microrganismos pode ser influenciado por fatores como: produtos metabólicos presentes na solução, atividade de diferentes enzimas celulares (como oxidases, desidrogenases), e variação da pressão de oxigênio resultante do consumo de oxigênio pelos microrganismos. A mudança para valores mais negativos de potencial de óxido-redução, durante as primeiras horas de medição da suspensão de *E. coli* O157:H7 contida em meio aeróbio, possa talvez ser relacionada com a queda da pressão de oxigênio dissolvido, causado pela respiração bacteriana. Após 8-9 horas, o potencial de óxido-redução do meio aeróbio de tratamento térmico (50 ml de meio TSYGB), foi reduzido para aproximadamente -300 mV, mantendo-se nesse nível durante o período de observação.

#### **4.7. Efeito das temperaturas equivalentes de tratamento térmico, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7**

Após o estabelecimento das condições dos tratamentos térmicos (item 4.3.), determinou-se o tempo para que células injuriadas de *E. coli* O157:H7 submetidas a tais condições, se recuperassem. Células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas, tratadas termicamente a 55°C por 100 minutos; 59°C por 5 minutos; e 61°C por 1 minuto. Após o resfriamento por 1 minuto, as células foram enumeradas para obtenção de valores de Número Mais Provável (NMP). Os frascos contendo a suspensão celular submetida a tratamento térmico, foram incubados a 30°C durante o período de enumeração.

Observou-se que as células sensíveis ao oxigênio se recuperaram mais rapidamente após tratamento térmico realizado em temperaturas mais elevadas, do que equivalentes tratamentos térmicos mais longos em temperaturas mais brandas (FIGURA 16a, b, c). As células submetidas a tratamento térmico de 55°C por 100 minutos (FIGURA 16a) necessitaram de mais de 20 horas para recuperarem sua sensibilidade ao oxigênio, comparativamente a 6 horas de recuperação para células tratadas termicamente a 59°C por 5 minutos (FIGURA 16b) e, de apenas 2 horas após o tratamento térmico a 61°C por 1 minuto (FIGURA 16c).

Isto demonstra, que à medida que se diminui a temperatura, com simultâneo aumento do tempo de tratamento térmico, as células se tornam mais sensíveis a uma posterior exposição ao oxigênio, necessitando de um maior período de tempo para que as células injuriadas atinjam níveis celulares similares aos obtidos por células não expostas ao oxigênio.

É reconhecido que alguns dos componentes celulares afetados pela injúria devido ao calor são as enzimas, tais como catalase e superóxido dismutase (BUCKER & MARTIN, 1982). As bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas possuem enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, que previnem os efeitos letais associados com a produção de compostos reativos de oxigênio. De acordo com DALMIER & MARTIN (1988), a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase produzidas por *Listeria monocytogenes* decresceu rapidamente quando este microrganismo foi submetido a aquecimento em temperaturas entre 55 e 60°C. As enzimas catalase e superóxido dismutase permitem que a célula microbiana reaja contra radicais reativos do oxigênio, como peróxido de hidrogênio e o radical superóxido, respectivamente, que são formados espontaneamente na presença do oxigênio (ANDERSON & FUNG, 1983). Caso ocorra acúmulo de peróxido de hidrogênio no meio, em presença de radicais superóxido, ocorre a formação de radicais hidroxila, o qual pode ser fatal para a célula. Admite-se, que a razão pela qual algumas células injuriadas não se recuperam após um tratamento térmico é devido a falta de substâncias viáveis que reajam com o oxigênio (RAY, 1989). Assim, a incapacidade de células microbianas de eliminar os radicais tóxicos formados durante a incubação em condição aeróbia, resulta em sua morte. Isto pôde ser comprovado por nossos resultados, onde células de *E. coli*

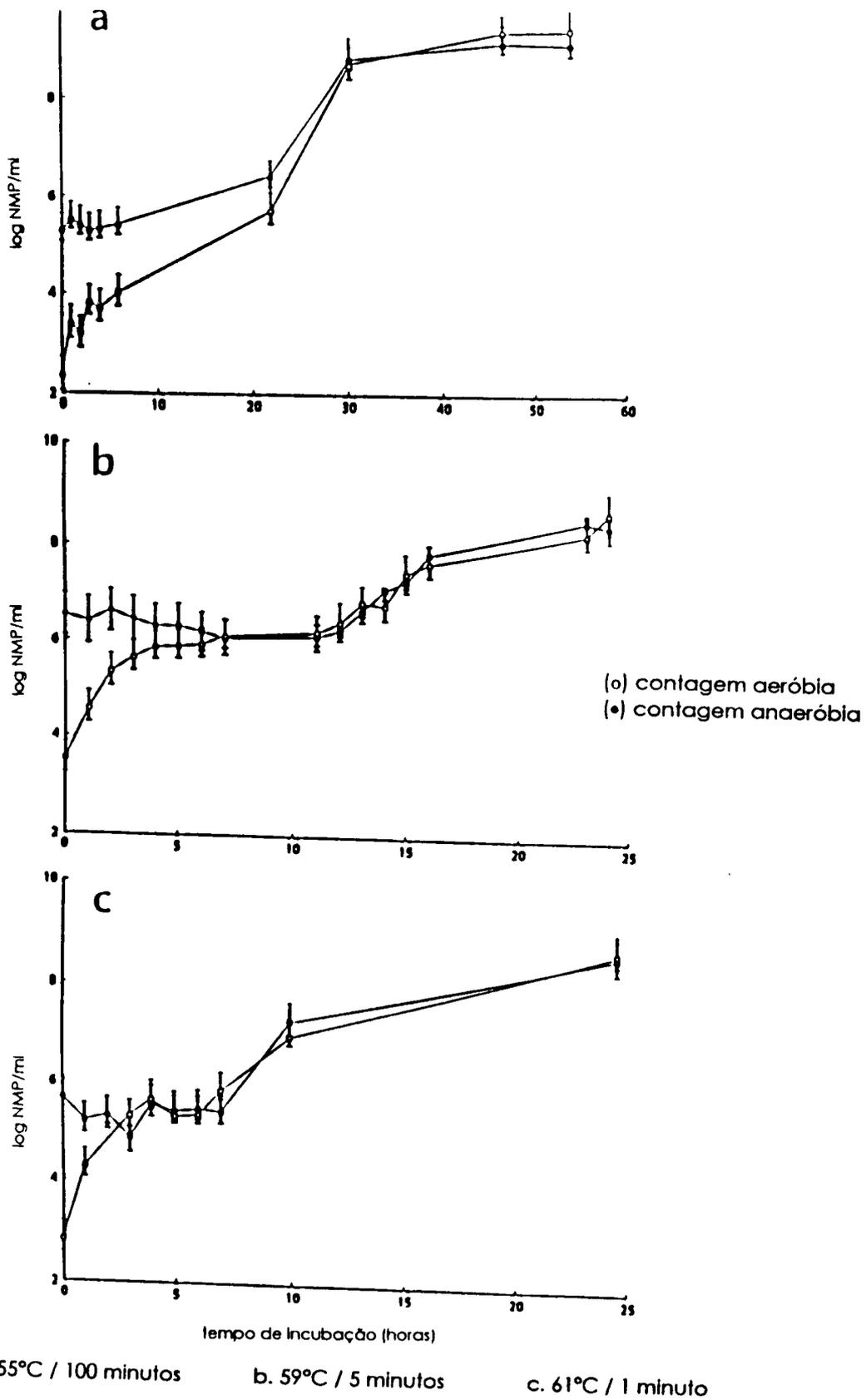


FIGURA 16. Efeito do tratamento térmico na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 incubadas em condições de anaerobiose a 30°C.

O157:H7 se recuperaram melhor em condições de baixas concentrações de oxigênio. As bactérias que possuem as enzimas catalase e superóxido dismutase inativadas, podem não ser capazes de sobreviverem em ambientes aeróbios, mas podem sobreviver sob condições anaeróbias, tais como as encontradas em alimentos embalados sob atmosfera modificada, contendo baixas concentrações de oxigênio. Além disso, o cozimento de alimentos diminui o potencial de óxido-redução (UGBOROGHO & INGHAM, 1994), o que pode também contribuir para a melhora da sobrevivência de bactérias injuriadas.

#### **4.8. Efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de anaerobiose**

Testou-se o efeito da temperatura de incubação na recuperação de *E. coli* O157:H7 submetida a tratamento térmico a 59°C. As temperaturas de incubação testadas foram de 5, 10, 20 e 30°C. As células foram cultivadas, submetidas a tratamento térmico a 59°C durante 5 minutos, resfriadas e incubadas em condições de anaerobiose nas temperaturas a serem testadas. As células de *E. coli* O157:H7 recuperaram sua habilidade de crescer em presença de oxigênio mais rapidamente, quando incubadas às temperaturas mais elevadas (FIGURAs 17a, b, c, d). As células incubadas sob condições de anaerobiose a 10, 20 e 30°C, foram capazes de recuperar sua habilidade de crescerem na presença de oxigênio, após aproximadamente 130, 50 e 6 horas, respectivamente. As células incubadas a 5°C, embora não tenham sido eliminadas, não recuperaram sua tolerância ao oxigênio, sobrevivendo no mesmo nível durante os 34 dias de observação.

Os resultados obtidos neste experimento, podem ser comparados aos obtidos por MEYER & DONNELLY (1992) com *Listeria monocytogenes*. Esses pesquisadores estudaram o efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de *L. monocytogenes* injuriadas pelo calor em leite, mostrando que a recuperação foi mais rápida em temperaturas de incubação mais elevadas. As células iniciaram sua recuperação após 8 a 10 dias a 4°C, e se recuperaram completamente em 16 a 19 dias; a

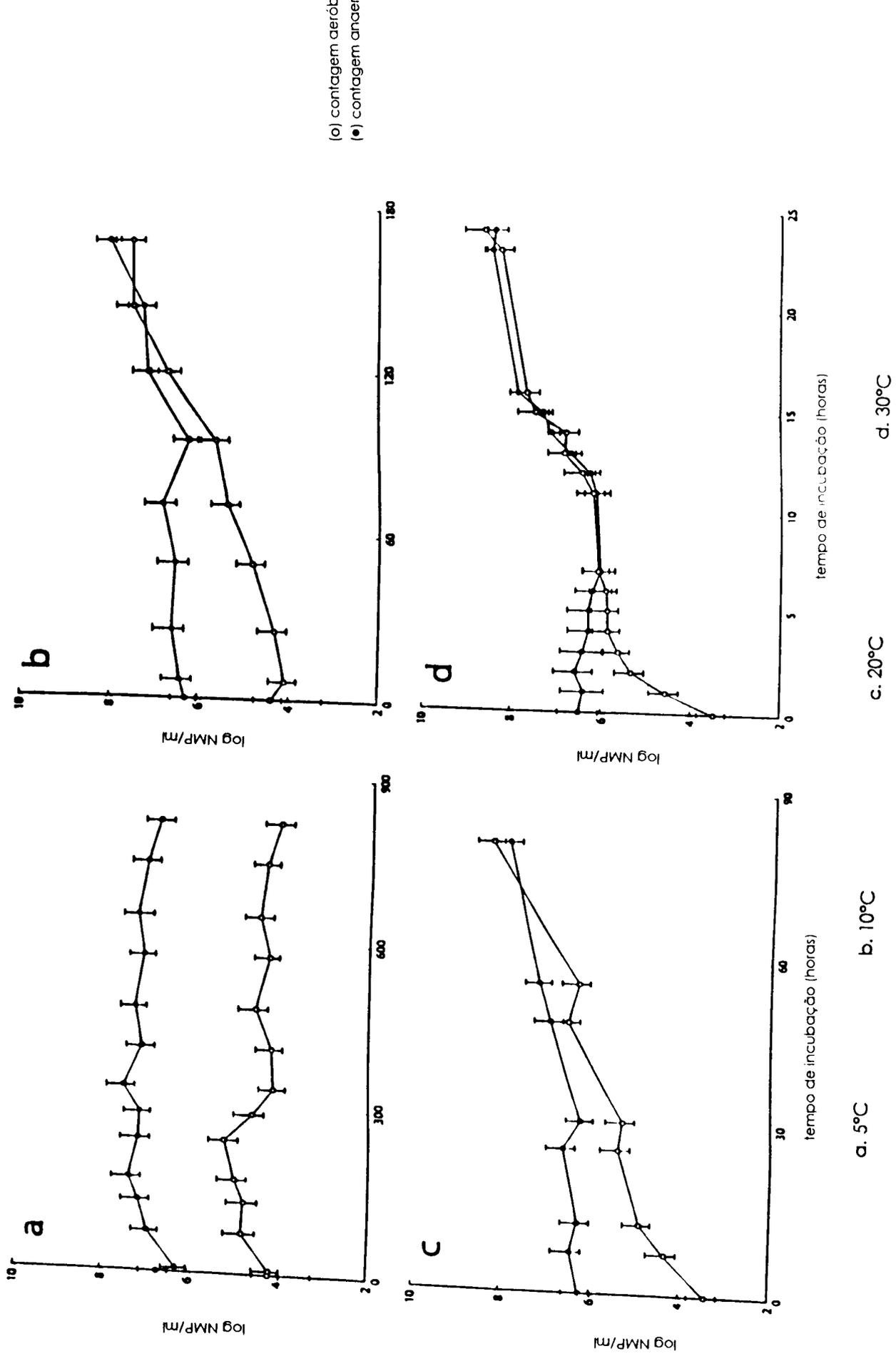


FIGURA 17. Efeito da temperatura de incubação na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos.

10°C a recuperação foi efetuada em 4 dias; e, a 26 e 37°C a recuperação ocorreu em 13 e 9 horas, respectivamente. Estes resultados podem explicar o motivo pelo qual, *E. coli* O157:H7 não é imediatamente detectada após um tratamento térmico, mas pode ser detectada após o armazenamento sob temperaturas de refrigeração.

Demonstramos, que o tradicional plaqueamento aeróbio das amostras de alimentos, para verificação de sua condição microbiológica quando realizado imediatamente após o alimento ter sido submetido a um tratamento térmico, pode não ser eficaz para detectar a presença de células injuriadas de *E. coli* O157:H7. Entretanto, se o mesmo método de enumeração for realizado após determinado período de tempo, as células podem ter se recuperado em níveis suficientes para serem detectadas por métodos aeróbios. Este período de tempo varia de acordo com as condições do tratamento térmico, além das temperaturas de armazenamento do alimento. Este trabalho mostrou que *E. coli* O157:H7 é capaz de se recuperar mais rapidamente após tratamento térmico que utiliza altas temperaturas (FIGURA 16), além de estocagem também em temperaturas mais elevadas (FIGURA 17). Assim, essas células podem se reparar mais rapidamente em alimentos submetidos a processamentos térmicos brandos e que são armazenados sob temperaturas abusivas. É importante que qualquer procedimento de detecção utilizado para *E. coli* O157:H7 leve em consideração as células em estado de injúria, não apenas porque este microrganismo apresenta uma dose infectante baixa (LIOR, 1994), mas também porque, as células injuriadas geralmente retêm suas características de patogenicidade, uma vez que uma considerável parcela da população de microrganismos em alimentos provavelmente se encontra em estado de injúria.

Atualmente, é verificado o aumento da demanda por produtos alimentícios cozidos e resfriados que apresentam vida-de-prateleira prolongada (CHURCH & PARSONS, 1993). Em geral, tais produtos são embalados à vácuo; minimamente processados (submetidos a processamentos térmicos que reduzem as formas vegetativas das bactérias em 4-6 ciclos log); e rapidamente resfriados às temperaturas de refrigeração (GENIGEORGIS, 1996). Este tipo de produto pode apresentar riscos sob o ponto de vista microbiológico, uma vez que a embalagem sob baixas concentrações de oxigênio inibe as bactérias aeróbias deterioradoras, reduzindo os números de competidores microbianos. As bactérias psicotróficas e anaeróbias facultativas podem sobreviver após

o tratamento térmico brando. Assim, dependendo da vida-de-prateleira do alimento, a combinação tempo-temperatura para o processamento térmico deve ser verificada. A resistência térmica do microrganismo e a habilidade de determinados microrganismos proliferarem em temperaturas de refrigeração, são fatores de importância em alimentos submetidos a tratamentos térmicos brandos e estocados sob refrigeração (MACKEY et al., 1994). Dessa forma, quanto mais longa for a vida-de-prateleira do alimento armazenado sob refrigeração, mais severo deve ser o tratamento térmico aplicado nestes alimentos, diminuindo os riscos à saúde dos consumidores.

#### **4.9. Efeito de diferentes concentrações de oxigênio, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de anaerobiose**

O meio TSYGB foi preparado sob 6 tipos diferentes de misturas gasosas. A concentração de oxigênio testada neste experimento variou de 0 (H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v) a 20% (TABELA 3), e o potencial de óxido-redução dos meios variou de -335,44 a +285,71 mV (TABELA 2). Células de *E. coli* O157:H7 cultivadas e submetidas a tratamento térmico (59°C por 5 minutos) sob condições de anaerobiose, foram recuperadas nos meios preparados. Imediatamente após o tratamento térmico, verificou-se que o número de células com habilidade para se desenvolver sob condições anaeróbias era de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml (FIGURA 18). À medida que se incluiu ao meio de recuperação concentrações de oxigênio de 2% ou mais, a recuperação das células foi substancialmente menor, aumentando o número de células injuriadas. As células expostas a concentrações de 5 e 20% de oxigênio, se repararam em aproximadamente 6 horas. As contagens aeróbias e anaeróbias apresentaram então, a mesma taxa de crescimento, atingindo a fase estacionária com aproximadamente 10<sup>8</sup> células/ml. Assim, o efeito do potencial de óxido-redução, aliado à concentração de oxigênio, influenciaram na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico a 59°C por 5 minutos. Condições de potencial de óxido-redução reduzidos e baixas concentrações de oxigênio, propiciaram uma melhor recuperação deste microrganismo.

Tabela 3. Composição do espaço-livre de meios de cultura preparados sob diferentes misturas gasosas.

MEIO	%O <sub>2</sub>	%N <sub>2</sub>	%CO <sub>2</sub>	%H <sub>2</sub>
*TSYGB H <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 10:90	0,64	87,87	0,95	10,54
TSYGB H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 10:50:40	1,02	42,7	52,57	3,71
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 0,5:99,5	1,45	96,61	2,52	-
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 1:99	1,58	97,28	0,73	-
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 2:98	3,33	94,27	4,45	-
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 5:95	2,26	93,59	1,71	-
TSYGB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 20:80	10,26	84,65	3,87	-
TSYGB O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 20:50:30	10,95	53,87	37,7	-
**TSB O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 20:80	13,39	74,86	2,09	-
Água destilada O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> , 20:80	20,87	79,87	0,29	-

\* TSYGB - caldo triptona de soja acrescido de 0,3% de extrato de levedura e 1% de glicose

\*\* TSB - caldo triptona de soja  
- não determinado

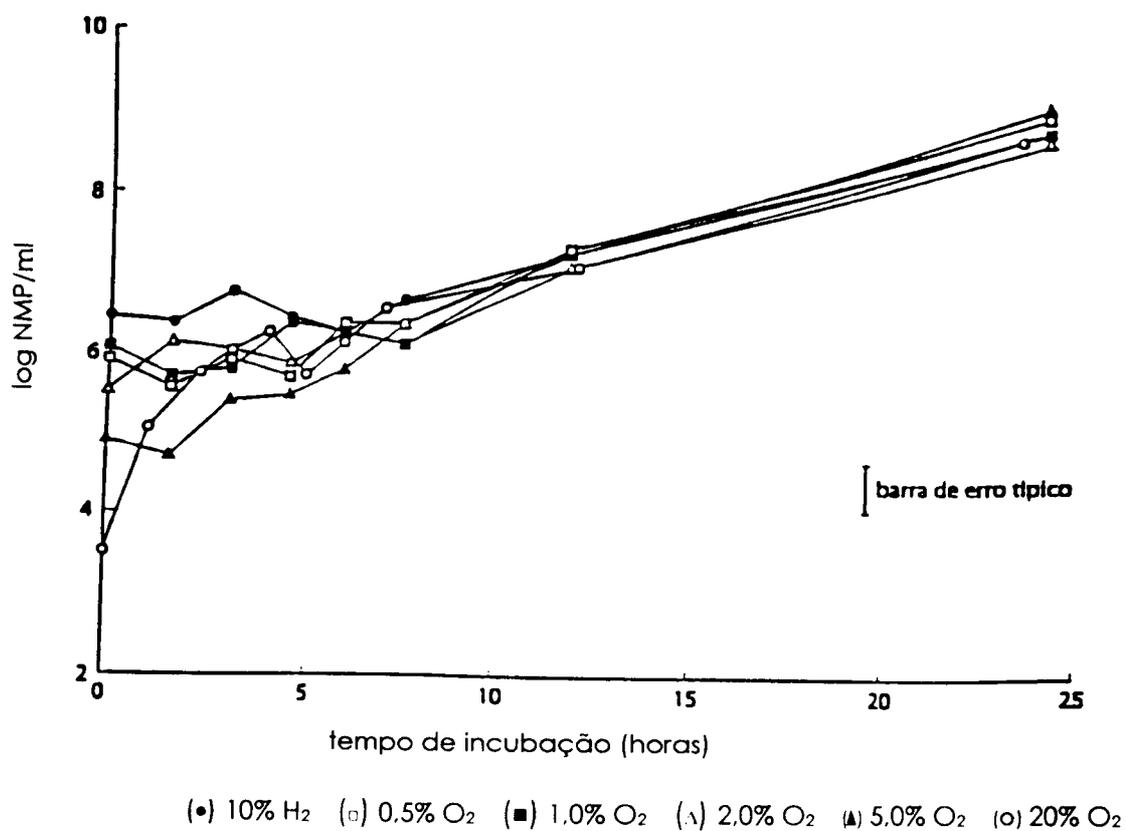


FIGURA 18. Efeito do tratamento térmico em condições de anaerobiose a 59°C por 5 minutos e temperatura de incubação a 30°C, no crescimento de células de *E. coli* O157:H7 em presença de diferentes concentrações de oxigênio.

#### **4.10. Efeito de gás carbônico na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico e incubadas sob condições de anaerobiose**

As células de *E. coli* O157:H7 foram cultivadas, submetidas a tratamento térmico a 59°C durante 5 minutos sob condições de anaerobiose (em meio TSYGB preparado sob H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:90 v/v), resfriadas e incubadas a 30°C. A enumeração dos sobreviventes foi realizada em intervalos, sendo incluído 50% de CO<sub>2</sub> nos meios aeróbio (meio TSYGB preparado sob O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:50:30 v/v) e anaeróbio (meio TSYGB preparado sob H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 10:50:90 v/v). De acordo com os resultados obtidos, constatou-se que após o tratamento térmico a 59°C por 5 minutos, células de *E. coli* O157:H7 não apresentaram sensibilidade ao CO<sub>2</sub> (FIGURA 19). As contagens, tanto em meio aeróbio como anaeróbio contendo 50% CO<sub>2</sub>, foram similares às contagens apresentadas pelos controles. As células sensíveis ao oxigênio cresceram em níveis semelhantes, tanto em meio contendo 50% CO<sub>2</sub>, como em sua ausência. O potencial de óxido-redução dos meios preparados sob 50% CO<sub>2</sub> foram de +328,15 mV e -212,98 mV para os meios aeróbio e anaeróbio, respectivamente (TABELA 2).

Embora, em carnes embaladas sob atmosfera modificada, o dióxido de carbono muitas vezes tenha ação bacteriostática sobre patógenos, como *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* (GARCÍA de FERNANDO et al., 1995), este gás não se mostrou inibitório contra *E. coli* O157:H7 em vegetais (HAO & BRACKETT, 1993). Em nosso experimento, dióxido de carbono não influenciou no reparo celular, e nem na sensibilidade ao oxigênio de células de *E. coli* O157:H7 termicamente injuriadas e expostas a esta atmosfera. As células expostas a mistura O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:50:30 (v/v/v), recuperaram sua sensibilidade ao oxigênio em aproximadamente 6 horas, tal como ocorreu com as células expostas ao gás O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 (v/v).

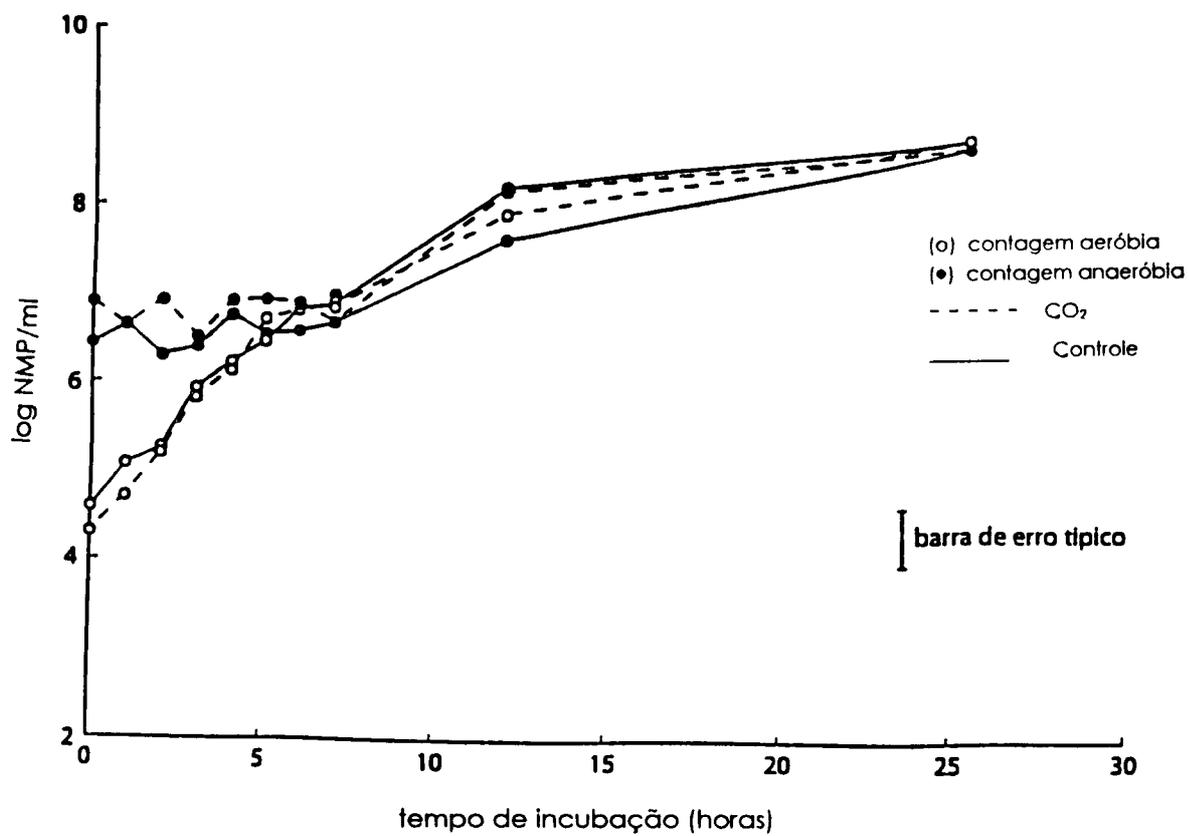


FIGURA 19. Efeito do tratamento térmico em condições de anaerobiose a 59°C por 5 minutos e temperatura de incubação a 30°C, no crescimento de células de *E. coli* O157:H7 em presença de 50% CO<sub>2</sub>.

#### **4.11. Efeito do choque térmico na resistência térmica e recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico sob condições de anaerobiose**

Para se determinar o efeito do choque térmico na resistência térmica de *E. coli* O157:H7 e avaliar sua sensibilidade ao oxigênio, as células deste microrganismo foram submetidas a choques térmicos, de 42 e 45°C durante 5 minutos, seguindo-se de tratamento térmico a 59°C por 5 minutos. Não se constatou uma diferença significativa na resistência térmica das células submetidas ao choque térmico a 42°C durante 5 minutos, comparadas ao controle (FIGURA 20). Contudo, observou-se um aumento na resistência térmica das células submetidas ao choque térmico de 45°C durante 5 minutos (FIGURA 21). Imediatamente após o tratamento térmico,  $5 \times 10^6$  células submetidas ao choque térmico a 45°C por 5 minutos foram capazes de crescer sob condições de anaerobiose, comparativamente a  $5 \times 10^5$  células não submetidas ao choque térmico, sob as mesmas condições. Dessas,  $5 \times 10^4$  células submetidas ao choque térmico foram capazes de crescer sob condições de aerobiose, comparativamente a  $5 \times 10^3$  células não submetidas ao choque térmico. Isto indica, que o choque térmico não afeta a sensibilidade das células ao oxigênio. Tanto células submetidas ao choque térmico ou não, se recuperaram em aproximadamente 6 horas, atingindo a fase estacionária simultaneamente.

Vários trabalhos demonstraram que o choque térmico brando, seguido de tratamento térmico resulta na obtenção de um valor D mais elevado ou menor destruição celular, conforme determinado pela contagem realizada em anaerobiose (LINTON et al., 1992; MURANO & PIERSON, 1992, 1993). Contudo, não é estabelecido se as células submetidas ao choque térmico são capazes de se recuperarem da injúria mais rapidamente que as células não submetidas ao choque térmico. No presente trabalho, as células foram expostas ao choque térmico em condições semelhantes às testadas por MURANO & PIERSON (1993). Estes pesquisadores relataram que o choque térmico a 42°C durante 5 minutos possibilitou a máxima recuperação de células de *E. coli* O157:H7, após a exposição das mesmas ao tratamento térmico de 55°C por 60 minutos. Os resultados obtidos no presente trabalho, mostram que células de *E. coli* O157:H7 submetidas a choque térmico a 45°C por 5 minutos apresentaram um aumento de sua resistência térmica e recuperação celular após o tratamento térmico de 59°C durante 5

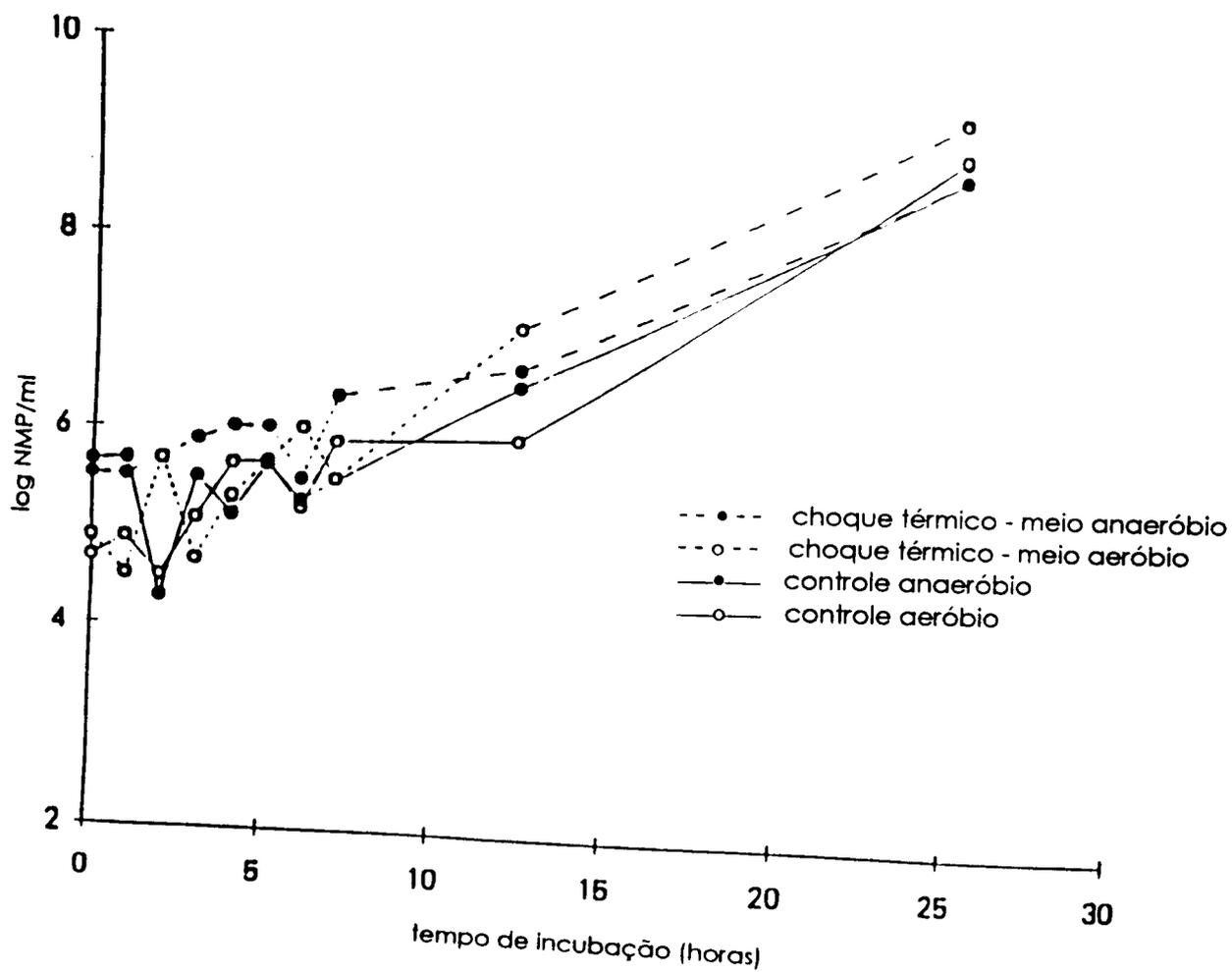


FIGURA 20. Efeito do choque térmico a 42°C por 5 minutos, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a posterior tratamento térmico a 59°C e incubadas sob anaerobiose a 30°C.

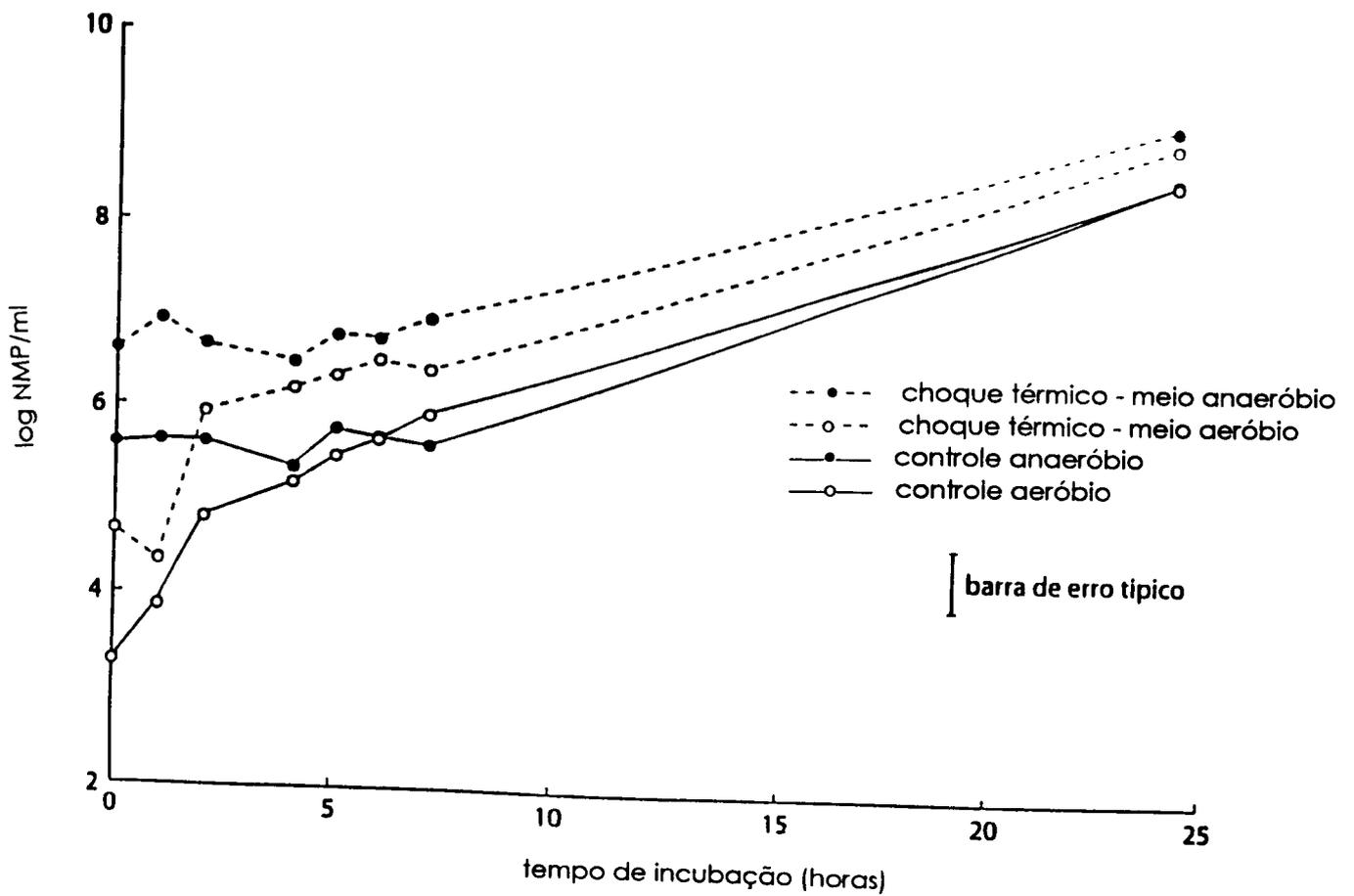


FIGURA 21. Efeito do choque térmico a 45°C por 5 minutos, na recuperação de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a posterior tratamento térmico a 59°C e incubadas sob anaerobiose a 30°C.

minutos, porém, o choque térmico a 42°C por 5 minutos não apresentou qualquer efeito sobre as células após o tratamento térmico. O aumento da recuperação celular obtido após o choque térmico e tratamento térmico, pode ser comparado ao demonstrado por MURANO & PIERSON (1993). Estes pesquisadores mostraram a ocorrência de um aumento no número log de células recuperadas em condições de aerobiose, após choque térmico de 45°C por 5 minutos, seguido de tratamento térmico de 55°C por 20 minutos, de 5,0 para 6,6 (1,6 ciclos log), comparado com os resultados obtidos no presente trabalho, que mostrou um aumento de 2,92 para 3,92 log de células (1,0 ciclo log). Na recuperação celular sob condições de anaerobiose, aqueles pesquisadores obtiveram um aumento de 4,9 para 5,3 log de células (0,4 ciclo log), comparado com 5,63 para 6,60 log de células (1,03 ciclo log) neste trabalho. Contudo, nosso trabalho mostrou que não existe indicação de que as células submetidas a choque térmico recuperam sua capacidade de crescimento em presença de oxigênio mais rapidamente do que as células não submetidas a choque térmico.

De acordo com os resultados obtidos, ao submetermos células de *E. coli* O157:H7 a choques térmicos, pode ocorrer uma melhora na habilidade das células de sobreviverem a temperaturas de processamento letais. Existe uma relação estabelecida entre o aumento da tolerância térmica bacteriana e a produção de proteínas do choque térmico. SPECTOR et al. (1986) relataram que células de *Salmonella typhimurium* cultivadas em condições de anaerobiose, foram capazes de sintetizar proteínas de choque térmico, sugerindo que as condições anaeróbicas por si só podem ser consideradas um fator de estresse para as células bacterianas. A prática de se embalar produtos cárneos crus, que serão submetidos a tratamentos térmicos posteriores, sob atmosfera modificada com baixas concentrações de oxigênio, pode então, estimular a sobrevivência de microrganismos patogênicos, como *E. coli* O157:H7, resultando em sérios perigos a saúde dos consumidores.

Nosso estudo mostrou, que o choque térmico pode aumentar a resistência de células de *E. coli* O157:H7 em pelo menos 1 ciclo log. Isto sugere, que o fenômeno do aumento da resistência térmica devido ao choque térmico deve ser considerado ao se determinar o processo térmico de alimentos. Condições de choque térmico podem ser

criadas em produtos alimentícios, principalmente quando esses são submetidos a tratamentos térmicos brandos. No processamento desses produtos, as baixas temperaturas de tratamento térmico e o prolongado período de tempo necessário para que o alimento atinja as temperaturas finais de tratamento térmico, podem criar um ambiente ideal para a ocorrência de choque térmico. Isto indica, que quanto mais lentamente ocorrer o aumento da temperatura, maior é o aumento da resistência térmica bacteriana. FARBER & BROWN (1990), inocularam salsichas com *Listeria monocytogenes* e pré-aqueceram este produto a 48°C por 30, 60 e 120 minutos. Células submetidas a choque térmico por 120 minutos apresentaram maior resistência térmica, comparativamente aos tratamentos por 30 e 60 minutos. QUINTAVALLA & CAMPANINI (1991) relataram que células de *L. monocytogenes* adquiriram maior resistência térmica quando submetidas a tratamentos térmicos mais lentos. Portanto, para se evitar aumentos consideráveis da resistência térmica de microrganismos, os alimentos submetidos a tratamentos térmicos devem atingir as temperaturas finais o mais rápido possível.

Em geral, na determinação de valores D para um determinado alimento, assume-se que todas as células bacterianas numa população possuam resistência térmica idêntica. Porém, no estabelecimento das condições de tratamento térmico para um determinado alimento, deveria ser levado em consideração o aumento da resistência térmica do microrganismo decorrente do choque térmico. A base teórica para o cálculo da letalidade deveria considerar a mudança da resistência térmica que ocorre durante o cozimento do alimento.

#### **4.12. Medida da composição do espaço-livre, potencial de óxido-redução e pH dos meios de cultura e alimentos**

A verificação da composição do espaço-livre dos meios de cultura produzidos estão apresentados na TABELA 3. Obteve-se meios de TSYGB aeróbios e anaeróbios, com níveis de oxigênio diferentes aos níveis injetados durante a manufatura desses. Também foi verificado que nos tubos esterilizados contendo meios a base de alimentos, o teor de oxigênio presente no espaço-livre apresentou-se em concentrações menores que

as injetadas durante o preparo dos mesmos (TABELA 4). Para esclarecer esse fato, preparou-se tubos contendo água destilada ou meio TSB (cuja formulação é mais pobre que TSYGB), sob mistura gasosa de O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 (v/v). Constatou-se a presença de 20,87% de oxigênio no tubo com água e de 13,39% no tubo com TSB, comparativamente a 10,26% de oxigênio no tubo com TSYGB, obtendo-se, portanto, níveis de oxigênio mais próximos aos injetados durante o preparo dos mesmos (TABELA 3). Dessa forma, demonstrou-se que o oxigênio não é perdido por vazamento. Isto sugere, que após a autoclavação ocorrem combinações químicas entre o oxigênio presente no espaço-livre e elementos do meio TSYGB ou dos alimentos, impossibilitando portanto, a detecção de oxigênio no espaço-livre. Em meios mais simples, por sua vez, o oxigênio não realiza essa combinação, podendo ser detectado no espaço-livre a níveis similares aos injetados para seu preparo.

Após a autoclavação, o nível de oxigênio no espaço-livre nos tubos de alimentos era de 0,9 a 2,0% nos tubos preparados em condições de anaerobiose, e de 5,4 a 16,5% nos preparados em aerobiose (TABELA 4). Isto sugere que o ar não é completamente removido dos alimentos preparados em anaerobiose. Na verdade, o método utilizado não incluiu um indicador para mostrar que todo o oxigênio foi removido durante o preparo do mesmo.

De acordo com as medições realizadas, o pH dos meios de cultura variou de 6,41 a 6,66 (TABELA 2). Quanto aos meios de alimentos, com exceção dos meios de vegetais (brócolis, cenoura e batata) e de carne bovina preparado sob aerobiose, o pH dos demais alimentos foi superior a 6,1 (TABELA 4).

As medidas do potencial de óxido-redução no fundo dos tubos (TABELA 4), mostraram que a carne bovina, carne de frango, cogumelo e brócolis eram todos muito reduzidos, mesmo quando preparados sob O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 20:80 (v/v), sendo que, apenas os tubos contendo leite (sob aerobiose), batata (sob aerobiose) e cenoura (sob aerobiose e anaerobiose), apresentaram um potencial de óxido-redução positivo. De acordo com LUND & WYATT (1984), o potencial de óxido-redução tem sido utilizado como importante instrumento para medição do grau de oxidação dos componentes de um meio de cultura ou alimento, especialmente em situações em que é difícil se medir baixas concentrações de oxigênio.

Tabela 4. Características dos alimentos preparados sob condições aeróbias e anaeróbias.

ALIMENTO	MISTURA GASOSA (v/v)	ESPAÇO-LIVRE (%O <sub>2</sub> )*	pH	POTENCIAL REDOX (mV) <sup>†</sup>		
				topo	fundo	diferença
batata	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	16,5	5,63	293,5	41,0	252,5
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	1,5	5,61	-365,3	-368,6	3,3
brócolis	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	9,5	5,15	-8,7	-68,4	59,7
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	1,1	5,42	-232,9	-217,9	-15,0
carne bovina	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	5,4	5,61	-138,5	-163,7	25,2
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	0,9	6,11	-220,8	-207,6	-13,1
carne de frango	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	10,4	6,24	56,6	-183,7	240,3
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	1,7	6,11	-336,8	-326,2	-10,6
cenoura	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	13,1	4,96	109,5	21,8	87,7
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	1,5	4,64	-346,8	344,9	-1,9
cogumelo	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	12,0	6,55	94,6	-134,1	228,7
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	1,1	6,59	-222,9	-200,5	-22,4
leite desnatado	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	14,7	6,22	-	254,3	-
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	2,0	6,26	-	-216,3	-
leite integral	O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (20:80)	12,9	6,24	-	173,7	-
	H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> (10:90)	1,3	6,17	-	-244,1	-

\* média de 5 leituras

† média de 3 leituras

- não determinado

#### 4.13. Detecção de crescimento de *E. coli* O157:H7 em alimentos

Não se detectou crescimento de *E. coli* O157:H7 nos tubos contendo os meios de brócolis, batata e cenoura. De acordo com LUND (1992), as propriedades dos vegetais que influenciam no crescimento de bactérias são o pH, o conteúdo de ácidos orgânicos, nutrientes e a presença de compostos antibacterianos.

O pH um pouco mais ácido apresentado por esses vegetais, pode não ser o responsável pela inibição de *E. coli* O157:H7. Esse microrganismo apresenta uma alta tolerância a acidez (BENJAMIN & DATTA, 1995), tendo sido isolado de diversos alimentos ácidos, como maionese (WEAGANT et al., 1994), cidra de maçã (BESSER et al., 1993), salame (DUFFY et al., 1996). Entretanto, CONNER & KOTROLA (1995) atribuíram a capacidade de *E. coli* O157:H7 de sobreviver sob condições de acidez ao tipo de acidulante. Esses autores testaram o efeito sobre *E. coli* O157:H7 dos ácidos acético, cítrico, láctico, málico, mandélico e tartárico, a pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5. A 4°C não constatou-se crescimento evidente desse microrganismo em nenhum dos tratamentos testados. A 10°C, *E. coli* O157:H7 apresentou crescimento em todos os ácidos testados excetuando o ácido acético, no qual não houve crescimento nos pHs testados. A 25 e 37°C, os ácidos apresentaram ação menos inibitória, evidenciada pelo crescimento a baixos valores de pH, comparativamente ao crescimento a 10°C. Os ácidos acético e mandélico foram os mais inibitórios, enquanto que, o tartárico apresentou menor eficiência contra *E. coli* O157:H7.

Fatores antimicrobianos presentes em vegetais foram relatados na literatura. NGUYEN-THE & LUND (1991) descreveram a ocorrência de compostos antibacterianos em cenouras. Substâncias liberadas em repolho macerado apresentaram um efeito bactericida sobre bactérias Gram negativas e, em menor intensidade, sobre bactérias Gram positivas (PEDERSON & FISHER, 1944). ABDUL-RAOUF et al. (1993b) relataram a presença de um fator desconhecido associado a cenouras, que pode inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7. A capacidade de crescimento de *L. monocytogenes* em repolho cru, porém não em repolho submetido a tratamento térmico, sugere que o

processamento pode diminuir a disponibilidade de certos nutrientes ou pode produzir constituintes que inibem o crescimento microbiano ou são tóxicos aos mesmos (BEUCHAT et al., 1986). Deve-se também considerar, que muitas vezes, a inibição de microrganismos pode ser devido aos tratamentos químicos conferidos aos vegetais durante a produção comercial (NGUYEN-THE & LUND, 1991).

#### **4.14. Efeito do tratamento térmico de *E. coli* O157:H7 em alimentos**

Testes para verificar o crescimento de *E. coli* O157:H7 em diversos alimentos, mostraram que este microrganismo requer condições específicas para seu desenvolvimento. Os meios de brócolis, batata e cenoura não possibilitaram a detecção de crescimento de *E. coli* O157:H7, pelos métodos utilizados. Dessa forma, os purês preparados com tais vegetais não foram submetidos a tratamento térmico. A TABELA 5 mostra os tempos necessários para que os meios inoculados atingissem a temperatura de referência, o tempo de tratamento térmico na temperatura de referência e o tempo de resfriamento. Um tratamento térmico típico a 59 e 61°C é exemplificado pela FIGURA 22.

Existe uma ampla diferença nos valores D de *E. coli* O157:H7 nos diversos alimentos testados (TABELA 6). O valor  $D_{59}$  obtido em nosso trabalho para carne bovina foi de 5,25 a 5,55 minutos; para carne de frango de 3,23 a 4,17 minutos; para cogumelo de 3,41 a 4,58 minutos; e para leite, de apenas 1,90 minutos ou menos. Para o valor  $D_{61}$ , obtivemos para carne bovina 0,77 minutos ou mais; para carne de frango 0,35 a 0,57 minutos; para cogumelo 0,40 a 0,99 minutos; e para leite 0,27 minutos ou menos.

Em relação ao potencial de óxido-redução dos meios de alimentos (TABELA 4), apenas o meio de cogumelo apresentou uma diferença entre os tubos aeróbios e anaeróbios, muito embora, mesmo no tubo preparado em aerobiose, o purê se apresentou muito reduzido no fundo do tubo. Não foi possível conseguir um potencial de óxido-redução mais elevado no purê de carne bovina, dessa forma, não se esperava obter diferenças nos valores D entre os meios aeróbios e anaeróbios. Em geral, o potencial de óxido-redução de alimentos é baixo (SNYDER, 1996), embora o potencial do leite preparado sob  $O_2/N_2$ , 20:80 (v/v) tenha sido elevado (174 e 254 mV).

Tabela 5. Sumário dos tratamentos térmicos aplicados a *E. coli* O157:H7 em alimentos.

ALIMENTO	TEMPERATURA DE REFERÊNCIA (°C)	TEMPO DE SUBIDA DA TEMPERATURA (minutos)	TRATAMENTO TÉRMICO (minutos)	RESFRIAMENTO (minutos)
carne bovina	59	5,25	19,83	1,00
carne bovina	61	5,33	1,50	1,42
carne bovina	61	5,42	1,67	1,50
carne de frango	59	5,33	14,75	1,00
carne de frango	61	5,33	1,42	1,58
carne de frango	61	5,33	1,58	1,58
cogumelo	59	5,50	15,08	0,92
cogumelo	61	5,17	1,50	1,58
cogumelo	61	5,67	0,92	1,33
leite desnatado	59	5,42	14,83	1,08
leite desnatado	61	5,33	1,50	1,42
leite integral	59	6,83	9,67	1,50
leite integral	61	7,42	0,92	1,58

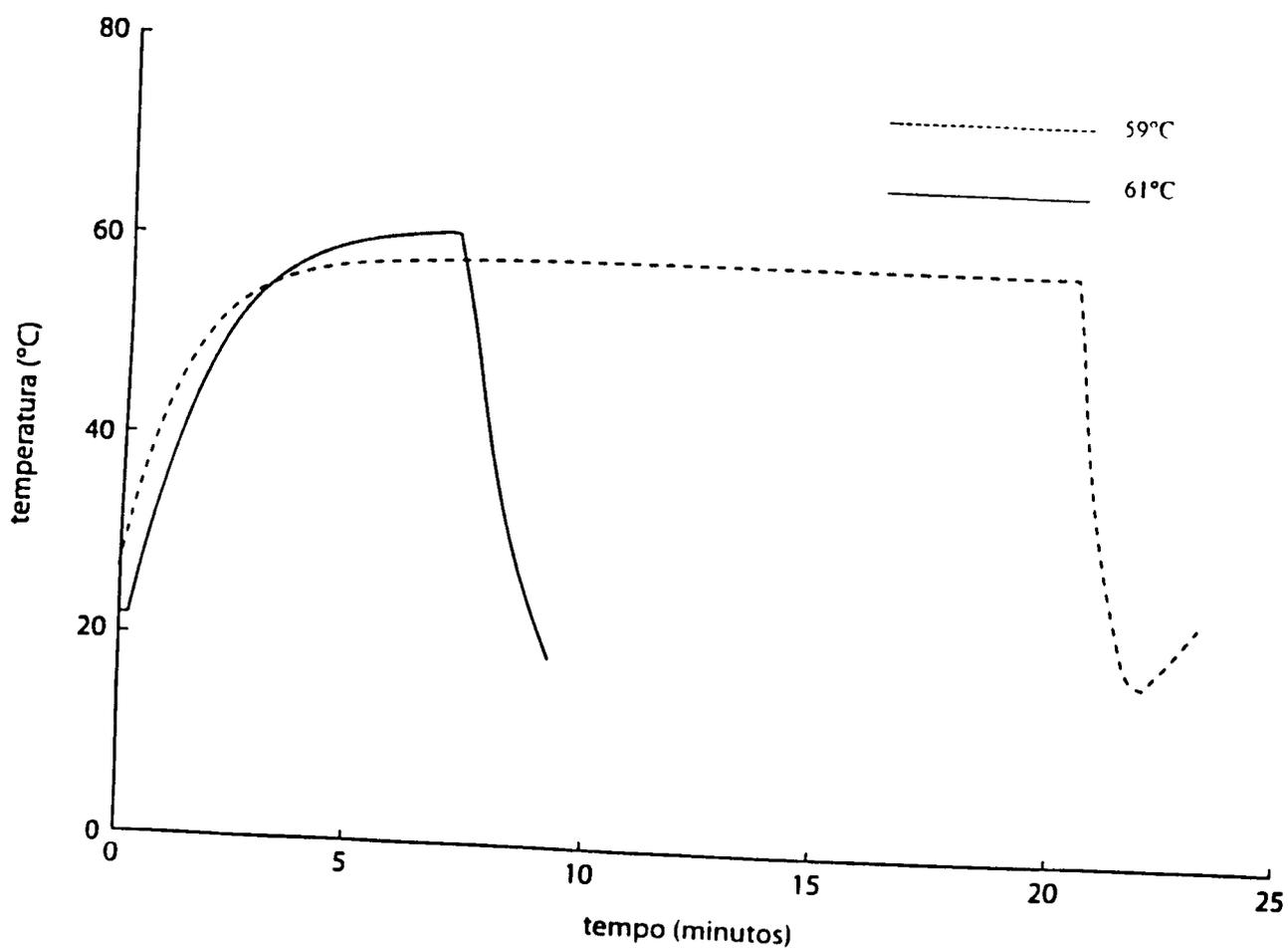


FIGURA 22. Curvas típicas de tratamento térmico para *E. coli* O157:H7 em alimentos.

Tabela 6. Valores D de *E.coli* O157:H7 em alimentos preparados sob condições aeróbias e anaeróbias.

ALIMENTO	TRATAMENTO TÉRMICO (°C)	TEMPO EQUIVALENTE (min)	INÓCULO (células/tubo*)	NMP SOBREVIVENTES		VALOR D (min)	
				AERÓBIO	ANAERÓBIO	AERÓBIO	ANAERÓBIO
carne bovina	59	24,40	9,15	4,52	4,52	5,27	5,27
	59	20,20	9,07	5,43	5,22	5,55	5,25
	61	2,00	8,95	>5,38	>5,38	>0,56	>0,56
	61	2,00	9,00	6,35	>7,38	0,77	>1,27
carne de frango	59	24,40	9,15	3,30	3,30	4,17	4,17
	59	14,70	9,07	5,24	4,51	3,85	3,23
	61	2,00	8,95	3,91	3,05	0,41	0,35
	61	1,80	9,00	5,23	5,81	0,48	0,57
cogumelo	59	26,80	9,15	<3,26	3,30	<4,55	4,58
	59	14,90	9,07	<3,26	4,69	<2,57	3,41
	61	1,80	8,95	5,20	>5,38	0,47	>0,5
	61	2,00	9,00	3,89	6,96	0,40	0,99
leite desnatado	59	14,64	9,07	<1,26	1,30	<1,87	1,90
	61	2,00	8,95	1,65	<1,26	0,27	<0,25
leite integral	59	8,90	9,37	<1,26	<1,26	<1,10	<1,10
	61	1,60	9,37	<1,26	<1,26	<0,19	<0,19

\* contagem por plaqueamento em condições de aerobiose

De acordo com dados apresentados pela literatura, existe uma variação significativa nos valores D para *E. coli* O157:H7 entre alimentos similares. O valor  $D_{60}$  para *E. coli* O157:H7 em carne bovina moída varia de 0,45 minutos em produto com 7% de gordura; 0,46 minutos em produto com 10% de gordura; 0,47 minutos em produto com 20% de gordura (AHMED et al, 1995); 0,75 minutos em produto com 17-20% de gordura (DOYLE & SCHOENI, 1984), e até valores mais elevados de 3,18 minutos em produto com 10% de gordura (SNYDER et al, 1996). As diferenças apresentadas entre esses valores podem ser atribuídas às variações entre as culturas (AHMED & CONNER, 1995), condições de armazenamento (JACKSON et al, 1995) e metodologia utilizada. O presente trabalho determinou um valor  $D_{59}$  entre 5,25 a 5,55 minutos para carne bovina moída, o qual é muito superior ao estimado por DOYLE & SCHOENI (1984), que obtiveram um valor  $D_{58,9}$  de 1,17 minutos. A carne bovina utilizada no trabalho de DOYLE & SCHOENI (1984), continha uma maior proporção de gordura (17 a 20%), comparada com 9,3% presente em nosso meio. AHMED et al. (1995) consideraram que o conteúdo de gordura em carne de frango apresenta uma propriedade protetora contra o calor. Esses autores obtiveram  $D_{60}$  de 0,38 minutos em carne de frango contendo 3% de gordura e 0,55 minutos em produto contendo 11% de gordura. Contudo, em carne bovina contendo 17 a 20% de gordura, DOYLE & SCHOENI, (1984) obtiveram  $D_{57,2}$  de 4,5 minutos, enquanto LINE et al., (1991) obtiveram  $D_{57,2}$  de 4,0 a 4,1 minutos em carne bovina com 2% de gordura. Nesse caso, ambos utilizaram métodos similares, tubos de morte térmica e plaqueamento aeróbio para a enumeração. De acordo com os resultados apresentados em nosso trabalho, o teor de gordura não representou um fator de proteção para *E. coli* O157:H7 contra o calor. Isto foi comprovado comparando-se a resistência térmica de *E. coli* O157:H7 em leite desnatado (0,1% de gordura) e integral (3,8% de gordura), onde obteve-se valores D mais elevados para leite desnatado. CLEMENTI et al. (1995) obtiveram para *E. coli*, em leite de cabra com 4,5% de teor de gordura, valores  $D_{58,6}$  e  $D_{61}$  de 0,289 e 0,081 minutos, respectivamente, comparados aos valores mais elevados obtidos no presente trabalho, onde *E. coli* O157:H7 em leite desnatado (0,1% de gordura), apresentou  $D_{59}$  de 1,9 minutos e  $D_{61}$  de 0,27 minutos.

Embora vários surtos de infecção causados por *E. coli* O157:H7 tenham sido relacionados ao consumo de carne moída ou leite (GRIFFIN & TAUXE, 1991), os estudos sobre inativação térmica demonstraram que esse microrganismo não apresenta

resistência térmica muito elevada comparativamente a outros patógenos (DOYLE, 1991). Esses surtos devem ter sido resultado do consumo de carne mal cozida e de leite não pasteurizado (DOYLE, 1994).

Em nossos testes, não foi observada uma grande diferença na recuperação de células injuriadas de *E. coli* O157:H7 nos meios de cultura a base de alimentos preparados na presença ou ausência de oxigênio. Isto pode ser atribuído a similaridade de valores reduzidos de potencial de óxido-redução dos meios preparados em condições aeróbias e anaeróbias (TABELA 4). Porém, foi verificado que o meio a base de cogumelo preparado sob anaerobiose, contribuiu para o aumento da resistência térmica de *E. coli* O157:H7. Os resultados obtidos sugerem que a atmosfera gasosa que envolve o produto pode influenciar no reparo dos microrganismos injuriados por tratamento térmico. Assim, as células de *E. coli* O157:H7 presentes em alimentos, podem ser injuriadas por tratamentos térmicos brandos e não serem recuperadas sob condições aeróbias. Dessa forma, métodos anaeróbios de enumeração deveriam ser utilizados para se determinar a sobrevivência de microrganismos anaeróbios facultativos em alimentos que são submetidos a tratamentos térmicos brandos, como pasteurização.

Os regulamentos elaborados por alguns órgãos ligados a saúde pública, como United States Department of Agriculture (USDA) e Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, listam uma variedade de tempos de cozimento, com a determinação dos tempos necessários para que as partes internas de um alimento atinjam a temperatura de referência para o tratamento térmico. No entanto, é sabido que fatores intrínsecos e extrínsecos associados a bactéria e ao ambiente em que essa se encontra ao ser submetida ao tratamento térmico, afetam a resposta ao calor. Os métodos de recuperação dos microrganismos utilizados nos estudos de resistência térmica podem influenciar nos resultados das análises (LINE et al., 1991). As técnicas de recuperação microbianas deveriam possibilitar a enumeração de todas as células viáveis, inclusive as células subletalmente injuriadas. Uma vez que a incubação de *E. coli* O157:H7 injuriada por tratamento térmico em ambiente aeróbio, resulta na redução do número de células recuperadas, como foi observado neste estudo, este fato deve ser considerado quando do estabelecimento de tratamentos térmicos, de modo a não colocar em risco a saúde dos consumidores.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e discutidos anteriormente, concluiu-se o seguinte:

1. Imediatamente após o tratamento térmico, células de *E. coli* O157:H7 apresentaram sensibilidade ao oxigênio, sendo que 99,9% das células que se mostraram capazes de crescer em condições anaeróbias não puderam crescer no meio aeróbio.
2. Células de *E. coli* O157:H7 submetidas a tratamento térmico em condições de aerobiose, necessitam de um período de tempo maior para recuperar sua sensibilidade ao oxigênio, comparativamente as células tratadas termicamente sob condições de anaerobiose.
3. A recuperação de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas pelo calor em condições aeróbias, é acompanhada pela queda do potencial de óxido-redução do meio. No caso das células submetidas ao tratamento térmico em condições anaeróbias, o potencial de óxido-redução não apresenta variações significativas durante o período de recuperação celular.
4. Células de *E. coli* O157:H7 injuriadas pelo calor se recuperam da sua sensibilidade ao oxigênio mais rapidamente após tratamento térmico em temperaturas mais elevadas, comparativamente aos tratamentos térmicos equivalentes que utilizam temperaturas mais brandas. Dessa forma, à medida que ocorre a redução da temperatura de tratamento térmico com simultâneo aumento do tempo, as células de *E. coli* O157:H7 injuriadas pelo calor se tornam mais sensíveis ao oxigênio, necessitando de um maior período de tempo para que tais células atinjam níveis de multiplicação similares aos das células expostas às condições anaeróbias.

5. Células de *E. coli* O157:H7 submetidas ao tratamento térmico em condições de anaerobiose e incubadas em temperaturas mais elevadas, recuperam sua habilidade de se multiplicar em presença de oxigênio mais rapidamente. Assim, células incubadas a 10, 20 e 30°C se recuperam da sua sensibilidade ao oxigênio após 130, 50 e 6 horas, respectivamente, enquanto que a 5°C, não se observou a recuperação celular, mas apenas sobrevivência no mesmo nível. Isto demonstra que a utilização de métodos aeróbios de avaliação microbiológica de um produto submetido ao tratamento térmico pode fornecer resultados subestimados, mesmo se o produto for analisado após longos períodos de estocagem em temperaturas de refrigeração.
6. O teor de oxigênio e o potencial de óxido-redução influenciam na recuperação das células de *E. coli* O157:H7 injuriadas por tratamento térmico. À medida que a concentração de oxigênio é aumentada no meio de recuperação, o que é verificado pela elevação do potencial de óxido-redução, ocorre uma diminuição na recuperação de células viáveis. Isto indica que condições de potencial de óxido-redução reduzidos e baixas concentrações de oxigênio, propiciam uma melhor recuperação de células de *E. coli* O157:H7 injuriadas pelo calor.
7. A inclusão de 50% de CO<sub>2</sub> no meio de recuperação aeróbio ou anaeróbio não interferiu na recuperação de *E. coli* O157:H7 submetida a tratamento térmico.
8. As condições de choque térmico a que são submetidas as células de *E. coli* O157:H7, pode aumentar a resistência térmica dessas células. Choque térmico a 42°C por 5 minutos não induziu aumento na resistência térmica de células de *E. coli* O157:H7 submetidas a posterior tratamento térmico a 59°C por 5 minutos. Contudo, o choque térmico a 45°C por 5 minutos contribuiu para aumentar a resistência térmica dessa bactéria em 10 vezes. Neste caso, células submetidas ao choque térmico

se recuperaram no mesmo período de tempo que as células não submetidas a choque térmico, tanto em condições aeróbias como anaeróbias.

9. Observou-se o crescimento de *E. coli* O157:H7 em meios de cultura a base de cogumelo e em alimentos de origem animal, como carne bovina, carne de frango e leite (desnatado e integral). Porém, não se detectou o crescimento desse microrganismo em meios a base de batata, brócolis e cenoura.
10. Condições anaeróbias e de potencial de óxido-redução reduzidos podem contribuir para o aumento da resistência térmica de *E. coli* O157:H7, como verificado no meio a base de cogumelo. Porém, o teor de oxigênio não influenciou de maneira significativa a resistência térmica desse microrganismo em carne bovina, carne de frango e leite.
11. O teor de gordura não representa um fator de proteção para *E. coli* O157:H7 contra o calor. Isto foi comprovado comparando-se a resistência térmica de *E. coli* O157:H7 em leite desnatado (0,1% de gordura) e integral (3,8% de gordura), onde obteve-se valores D mais elevados para leite desnatado.
12. Para se assegurar de que um tratamento térmico brando aplicado a um alimento foi eficaz sob o ponto de vista microbiológico, deve considerar-se entre outros fatores, as condições de atmosfera gasosa que envolve o alimento, o potencial de óxido-redução e o aumento da resistência térmica decorrentes do choque térmico. Além disso, os métodos de avaliação microbiológica desses alimentos devem garantir a recuperação dos microrganismos injuriados pelo tratamento térmico, cujo resultado foi melhor em condições de anaerobiose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDUL-RAOUF, U.M.; BEUCHAT, L.R.; AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.8, p.2364-2368, 1993a.
2. ABDUL-RAOUF, U.M.; BEUCHAT, L.R.; AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.7, p.1999-2006, 1993b.
3. AHERN, H. Cellular responses to oxidative stress. **ASM News**, Washington, v.57, n.12, p.627-629, 1991.
4. AHMED, N.M.; CONNER, D.E. Evaluation of various media for recovery of thermally-injured *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.4, p.357-360, 1995
5. AHMED, N.M.; CONNER, D.E.; HUFFMAN, D.L. Heat-resistance of *E. coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.6, p.606-610, 1995.
6. AMIN, V.; OLSON, N. Influence of catalase activity on resistance of a coagulase-positive staphylococci to hydrogen peroxide. **Applied Microbiology**, Washington, v.16, n.2, p. 267-270, 1968.
7. ANDERSON, K.L.; FUNG, D.Y.C. Anaerobic methods, techniques and principles for food bacteriology: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.9, p.811-822, 1983.

8. ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation and stationary phase-induced acid tolerance in *E. coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.5, p.2037-2039, 1995.
9. AROCHA, M.M.; MCVEY, M.; LODER, S.D.; RUPNOW, J.H.; BULLERMAN, L. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.5, p.379-381, 1992.
10. BENJAMIN, M.M.; DATTA, A.R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.4, p.1669-1672, 1995.
11. BESSER, R.E.; LETT, S.M.; WEBER, J.T.; DOYLE M.P.; BARRETT, T.J.; WELLS, J.G.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.269, n.17, p.2217-2220, 1993.
12. BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E.; HAO, D.Y.Y.; CONNER, D.E. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.32, n.10, p.791-795, 1986.
13. BEUCHAT, L.R.; LECHOWICH, R.V. Survival of heat *Streptococcus faecalis* as affected by phase of growth and incubation temperature after thermal exposure. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.31, n.4, p.414-419, 1968.

14. BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M.A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n.11, p.2559-2564, 1989.
15. BOHRA, L.K.; PHEBUS, R.K.; KASTNER, C.L. Influence of glucose oxidase on the growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* in universal preenrichment broth. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.4, p.87-94, 1995.
16. BOYCE, T.G.; SWERDLOW, D.L.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic syndrome. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.10, n.6, p.364-368, 1995.
17. BRECHT, P.E. Use of controlled atmospheres to retard deterioration of produce. **Food Technology**, Chicago, v.34, n.3, p.45-50, 1980.
18. BREWER, D.G.; MARTIN, S.E.; ORDAL, Z.J. Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.34, n.6, p.797-800, 1977.
19. BROWN, M.H.; EMBERGER, O. **Microbiological ecology of foods**. Toronto: Academic Press, 1980. Oxidation-reduction potential, v.1, p.112-126.
20. BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology**, Washington, v.142, n.11, p.3305-3315, 1996.

21. BUCKER, E.R.; MARTIN, S.E. Superoxide dismutase activity in thermally stressed *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.41, n.2, p.449-454, 1981.
22. BUCKER, E.R.; MARTIN, S.E. Effect of free-radical scavengers on enumeration of thermally stressed cells of *Staphylococcus aureus* MF-31. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, n.5, p.1020-1025, 1982.
23. BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; TIERNEY, J.T.; PEELER, J.T. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.10, p.3216-3219, 1990.
24. BUSTA, F.F. Introduction to injury and repair of microbial cells. **Advances in Applied Microbiology**, v.23, p.195, 1978.
25. CARTER, A.O.; BORCZYK, A.A.; CARRLSON, J.A.; HARVEY, B.; HOCKIN, J.C.; KARMALI, M.A.; KRISHNAN, M.A.C.; KORN, D.A.; LIOR, H. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 - associated hemorrhagic colitis in a nursing home. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.317, n.24, p.1496-1500, 1987.
26. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary report: foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - Western United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Washington, v.42, n.4, p.85-86, 1993a.
27. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update: multistate outbreak O157:H7 infections from hamburgers - Western United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Washington, v.42, p.258-263, n.14, 1993b.

28. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Washington, v.44, n.9, p.157-160, 1995.
29. CHAPMAN, P. A. Evaluation of commercial latex slide test for identifying *Escherichia coli* O157. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.42, n.10, p.1109-1110, 1989.
30. CHAPMAN, P.A.; SIDONS, C.A; WRIGHT, D.J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *E. coli* O157:H7 infection in man. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.11, p.439-447, 1993.
31. CHAPMAN, P.A.; SIDONS, C.A.; ZADIK, P.M.; JEWES, L. An improved selective medium for the isolation of *E. coli* O157:H7. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.35, p.107-110, 1991.
32. CHAPMAN, P.A.; WRIGHT, D.J.; HIGGINS, R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157. **The Veterinary Record**, London, v.14, p.171-172, 1993.
33. CHEVILLE, A.M.; ARNOLD, K.W.; BUCHRIESER, C.; CHENG, C.M.; KASPAR, C.W. *rpoS* Regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1822-1924, 1996.
34. CHRISTMAN, M.F.; MORGAN, R.W.; JACOBSON, F.S.; AMES, B.N. Positive control of regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. **Cell**, Cambridge, v.41, n.3, p.553-762, 1985.

35. CHURCH, I.J.; PARSONS, A.L. Review: sous vide cook-chill technology. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.28, n.6, p.563-574, 1993.
36. CIMOLAI, N.; CARTER, J.E. Gender and the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to haemolytic uraemic syndrome. **Archives of Disease in Childhood**, London, v.66, n.1, p.171-172, 1991.
37. CIMOLAI, N.; CARTER, J.E.; MORRISON, B.J.; ANDERSON, J.D. Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.116, n.4, p.589-592, 1990.
38. CLAVERO, M.R.S.; BEUCHAT, L.R. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.9, p.3268-3273, 1995.
39. CLAVERO, M.R.S.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.8, p.2735-2740, 1996.
40. CLEMENTI, F.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ADDARIO, A.; MORESI, M. Heat resistance of *Escherichia coli* in goat milk: a comparison between the sealed capillary tube technique and a laboratory slug flow heat exchanger. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v.7, n.3, p.235-243, 1995.
41. CONNER, D.E.; HALL, G.S. Efficacy of selective media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. **Food Microbiology**, London, v.11, n.4, p.337-344, 1994.

42. CONNER, D.E.; HALL, G.S. Temperature and food additives affect growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry meat. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.16, n.3, p.150-153, 1996.
43. CONNER, D.E.; KOTROLA, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.1, p.382-385, 1995.
44. COX, C.S.; HECKLY, R.J. Effects of oxygen upon freeze-dried and freeze-thawed bacteria: viability and free radical studies. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.19, n.3, p.189-194, 1973.
45. COWAN, S.T. Gram-negative facultatively anaerobic rods. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: The Williams & Wikins Company, 1974. chap.8, p.290-340.
46. CRAIG, E.A. The heat shock response. **Critical Review Biochemical**, Cleveland, v.18, p.239-280, 1985.
47. CUTTER, C.N.; SIRAGUSA, G.R. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.2, p.97-103, 1994.
48. CZAJKA, J.; BATT, C.A. A solid phase fluorescent capillary immunoassay for the detection of *E. coli* O157:H7 in ground beef and apple cider. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.6, p.601-607, 1996.

49. CZECHOWICZ, S.M.; SANTOS, O.; ZOTTOLA, E.A. Recovery of thermally-stressed *Escherichia coli* O157:H7 by media supplemented with pyruvate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, n.2/3, p.275-284, 1996.
50. DALLMIER, A.W.; MARTIN, S.E. Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury os *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.2, p.581-582, 1988.
51. DORN, C.R. *Escherichia coli* O157:H7. **JAVMA**, v.206, n.10, p.1583-1585, 1995.
52. DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, n.4, p.289-302, 1991.
53. DOYLE, M.P. The emergence of new agents of foodborne disease in the 1980s. **Food Research International**, Essex, v.27, n.3, p.219-226, 1994.
54. DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.4, p.855-856, 1984.
55. 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, n.10, p.2394-2396, 1987.
56. DUFFY, G.; RIODAN, D.C.R.; SHERIDAN, J.J.; WHITING, R.C.; EBLEN, B.S. *Escherichia coli* O157:H7 in fermented meats. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 42., 1996, 1-6 September. **Poster proceedings**. Lillehammer: Matforsk, Norwegian Food Research Institute, 1996. p.4-5.

57. DUNCAN, S.E.; CAMERON, R.H. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.14, n.11, p.656-660, 1994.
58. FAITH, N.G.; SHERE, J.A.; BROSCH, R.; ARNOLD, K.W.; ANSAY, S.E.; LEE, M.S.; LUCHANSKY, J.B.; KASPAR, C.W. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1519-1525, 1996.
59. FARBER, J.M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology - a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.1, p.58-70, 1991.
60. FARBER, J.M.; BROWN, B.E. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.6, p.1584-1587, 1990.
61. FARBER, J.M.; DALEY, E. Fate of *Listeria monocytogenes* on modified package turkey roll slices. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.12, p.1098-1100, 1994.
62. FARBER, J.M.; WARBURTON, D.W.; GOUR, L.; MILLING, M. Microbiological quality of foods packaged under modified atmospheres. **Food Microbiology**, London, v.7, n.4, p.327-334, 1990.
63. FEDIO, W.M.; JACKSON, H. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.9, n.5, p.157-160, 1989.
64. FENG, P.C.S.; HARTMAN, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, n.6, p.1320-1329, 1982.

65. FERNANDEZ, P.S.; GEORGE, S.M.; SILLS, C.C.; PECK, M.W. Predictive model of the effect of CO<sub>2</sub>, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, 1997 (In press).
66. FRATAMICO, P.M.; BHADURI, S.; BUCHANAN, R.L. Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-Mda plasmid and on 60-Mda plasmid-cured derivatives. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.39, p.371-381, 1993.
67. GADZELLA, T.A.; INGHAM, S.C. Heat shock, anaerobic jar incubation and fluid thioglycollate medium have contrasting effects on D-values of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.8, p.671-673, 1994.
68. GARCÍA de FERNANDO, G.D.; NYCHAS, G.J.E.; PECK, M.W.; ORDÓÑEZ, J. A. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.221-231, 1995.
69. GENIGEORGIS, C. Thermal destruction of pathogens in processed meats. In: HINTON, M.H.; ROWLINGS, C. (Ed.) **Factors affecting the microbial quality of meat: cutting and further processing**. Proceedings of a meeting held at the Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine. Berlin, 6-8 May, 1996. Bristol: University of Bristol Press, [1996]. p.75-95.
70. GEORGE, S.M.; RICHARDSON, L.C.C.; POL, I.E.; PECK, M.W. Effect of oxygen concentration and redox potential on recovery of sub-lethally heat-damaged cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, 1997 (In press).

71. GLASS, K. A.; LOEFFELHOLZ, J.M.; FORD, J.P.; DOYLE, M.P. Fate of *E. coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.8, p.2513-2516, 1992.
72. GREGORY, E.M.; FRIDOVICH, I. Oxygen metabolism in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.117, n.1, p.166-169, 1974.
73. GRIFFIN, P.M.; RIES, A.A.; GREENE, K.D. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: a multicenter surveillance project. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.13, n.10, p.598, 1993.
74. 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.
75. GROSSMAN, A.D.; STRAUSS, D.B.; WALTER, W.A.; GROSS, C.A. Sigma<sup>32</sup> synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. **Genes & Development**, New York, v.1, p.179-184, 1987.
76. GROSSMAN, A.D.; TAYLOR, W.E.; BURTON, Z.F.; BURGESS, R.R.; GROSS, C.A. Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock proteins. **Journal of Molecular Biology**, v.186, p.357-365, 1985.
77. GUNZER, F.H.; BOHM, H.; RUSSMAN, H.; BITZAN, M.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic-syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.7, p.1807-1810, 1992.

78. GUTIERREZ, E.; NETLEY, G. Japanese *Escherichia coli* outbreak is still puzzling health officials. **The Lancet**, London, v.348, n.24, p.540, 1996.
79. HAHN, G.M.; LI, G.C. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. **Radiation Research**, San Diego, v.92, n.3, p.452-457, 1982.
80. HAMMACK, T.S.; FENG, P.; AMAGUANA, R.M.; JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; ANDREWS, W.H. Comparison of Sorbitol MacConkey Agar and Hemorrhagic Coli Agar for the recovery of *E. coli* O157:H7 from selected high-moisture dairy foods. In: AOAC INTERNATIONAL MEETING AND EXPOSITION, 108., 1994, Portland Oregon, **Abstract**. Arlington:AOAC, 1994. p.30.
81. HANSEN, T.B.; KNOCHEL, S. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during rapid and slow heating in sous vide cooked beef. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, n.6, p.425-428, 1996.
82. HAO, Y.Y.; BRACKETT, R.E. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in modified atmosphere. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.4, p.330-332, 1993.
83. HINDLE, M.A.; BOLTON, E.J.; WRIGHT, P.A.; DURBAND, C.A. Improved detection of vero-cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in faecal samples by enrichment culture. **PHLS Microbiology Digest**, v.12, p.71-73, 1995.
84. HOSKINS, C.B.; DAVIDSON, P.M. Recovery of *Clostridium perfringens* from food samples using an oxygen-reducing membrane fraction. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.3, p.187-191, 1988.

85. HUNGATE, R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, X.; RIBBONS, X. (Ed.) **Methods in Microbiology**. 3.ed. London: Academic Press, 1969. p. 117-132.
86. HURLEY, M.A.; ROSCOE, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.55, n.1, p.159-164, 1983.
87. HURST, A. Bacterial injury: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.23, n.8, p.935-944, 1977.
88. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. 12 ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. 320 p.
89. JACKSON, T.C.; HARDIN, M.D.; ACUFF, G.R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.3, p.230-237, 1995.
90. JACKSON, M.P.; NEIL, R.J.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K.; NEWLAND, J.W. Nucleotide sequence analysis na 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.
91. JACOB, H.E. Redox potential. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Ed.) **Methods in microbiology**. London: Academic Press, 1970. v.2, p.91-123.
92. JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 3.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1986. p.331-345.

93. JENKINS, D.E.; SCULTZ, J.E.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n.9, p.3910-3914, 1988.
94. JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; BEZANSON, G.S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **The Lancet**, London, v.1, n.8314/5, p.76, 1983.
95. JUNEJA, V.K.; CALL, J.E.; MARMER, B.S.; MILLER, A.J. The effect of temperature abuse on *Clostridium perfringens* in cooked turkey stored under air and vacuum. **Food Microbiology**, London, v.11, n.3, p.187-193, 1994.
96. KARCH, H.; HEESEMANN, J.; LAUFS, R.; O'BRIEN, A.D.; TACKET, C.O.; LEVINE, M.M. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.55, n.2, p.455-461, 1987.
97. KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between idiopathic Hemolytic Uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.151, n.5, p.775-782, 1985.
98. KEENE, W.E.; McANULTY, J.M.; HOESLY, F.C.; WILLIAMS Jr., P.; HEDBERG, K.; OXMAN, G.L.; BARRETT, T.J.; PFALLER, M.A.; FLEMUNG, D.W. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.331, n.9, p.579-584, 1994.
99. KELLOGG, E.W.; FRIDOVICH, I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase system. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.250, n.22, p.8812-8816, 1975.

100. KITTELL, F.B.; PADHYE, V.V.; DOYLE, M.P. Characterization and inactivation of verotoxin-1 produced by *E. coli* O157:H7. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.39, n.1, p.141-145, 1991.
101. KNABEL, S.J.; THIELEN, S.A. Enhanced recovery of severely heat-injured, thermotolerant *Listeria monocytogenes* from USDA and FDA primary enrichment media using a novel, simple, strictly anaerobic method. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.1, p.29-34, 1995.
102. KNABEL, S.J.; WALKER, H.W.; HARTMAN, P.A.; MEDONÇA, A.F. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.2, p.370-376, 1990.
103. KNIGHT, P. Hemorrhagic *E. coli*: the danger increases. **ASM News**, Ann Arbor, v.59, p.247-250, 1993.
104. KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v.18, n.3, p.775-779, 1977.
105. KOOIMAN, W.J.; GEERS, J.M. A simple and accurate technique for the determination of heat resistance of bacterial spores. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.38, n.2, p.185-189, 1975.
106. KREUGER, J.H.; WALKER, G.C. *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an htpR<sup>+</sup>-dependent fashion. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.81, p.1499-1503, 1984.
107. LECHOWICH, R.V. Microbiological challenges of refrigerated foods. **Food Technology**, Chicago, v.57, n.12, p.84-89, 1988.

108. LEISTNER, L.; GORRIS, G.M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.6, n.2, p.41-45, 1995.
109. LEISTNER, L.; MIRNA, A. Das redox potential von pokelladen. **Die Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.8, p.659-666, 1959.
110. LEMA, M.W.; BROWN, A.; BUTLER, C. A.; HOFFMAN, P.S. Heat-shock response in *Legionella pneumophila*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.34, n.12, p.1148-1153, 1988.
111. LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal of Infections Diseases**, Chicago, v.155, n.3, p.377-389, 1987.
112. LEVINE, M.M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v.6, p.31-51, 1984.
113. LINE, J.E.; FAIN Jr., A.R.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Escherichia coli*: D-value and z-value determinations in ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.762-766, 1991.
114. LINGWOOD, C.A.; LAW, H.; RICHARDSON, S.E.; PETRIC, M.; BRUNTON, J.L.; de GRANDIS, S.; KARMALI, M. Glycolipid binding of natural and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in-vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.262, n.4, p.1779-1785, 1987.
115. LINTON, R.H.; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.924-927, 1990.

116. LINTON, R.H.; WEBSTER, J.B.; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R.; HACKNEY, C.R. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.2, p.84-87, 1992.
117. LIOR, H.C. *E. coli* O157:H7 and verotoxigenic *E. coli*. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.13, n.10, p.592, 1993.
118. LIOR, H.C. *Escherichia coli* O157:H7 and verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.14, n.7, p.378-382, 1994.
119. LOEWEN, P.C. Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of KatE, a locus that affects catalase activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.157, n.2, p.622-626, 1984.
120. LOUIE, M.; De AZAVEDO, J.C.; HANDELSMAN, M.Y.; CLARK, C.G.; ALLY, B.; DYTOC, M.; SHERMAN, P.; BRUNTON, J. Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, n.10, p.4085-4092, 1993.
121. LUND, B.M. Ecosystems in vegetable foods. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, p.115S-126S, 1992. Symposium Supplement.
122. LUND, B.M.; WYATT, G.M. The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of *Clostridium botulinum* type E from spore inocula. **Food Microbiology**, London, v.1, n.1, p.49-65, 1984.

123. MACKEY, B.M.; BOOGARD, E.; HAYES, C.M.; BARANYI, J. Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.4, p.227-237, 1994.
124. MACKEY, B.M.; DERRICK, C.M. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.61, n.5, p.389-393, 1986.
125. MACKEY, B.M.; GIBSON, G.R. *E. coli* O157:H7: from farm to fork and beyond. **SGM Quartely**, p.55-57, May, 1997.
126. MACKEY, B.M.; SEYMOUR, D.A. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, Berks, v.133, n.6, p.1601-1610, 1987.
127. MADDEN, J.M. The enterics as foodborne pathogens. **Food Research International**, Essex, v.27, n.3, p.227-232, 1994a.
128. MADDEN, J.M. Concerns regarding the occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* O157:H7 in foods regulated by the U.S. food and drug administration. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.14, n.5, p.262-267, 1994b.
129. MARCH, S.B.; RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *E. coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, n.5, p.869-972, 1986.
130. MARTIN, D.L.; MacDONALD, K.L.; WHITE, K.E.; SOLER, J.T.; OSTERHOLM, M.T. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. **New England Journal of Medicine**, London, v.323, n.17, p.1161-1167, 1990.

131. MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D.; WELLS, J.G.; POTTER, M.E.; HEDBERG, K.; WACHSMUTH, I.K.; TAUXE, R.V.; DAVIS, J.P.; ARNOLDI, J.; TILLELI, J. Isolation of *E. coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytical uraemic syndrome. **The Lancet ii**, London, v.2, n.8514, p.1043, 1986.
132. MARTIN, S.E.; FLOWERS, R.S.; ORDAL, Z.J. Catalase: its effect on microbial enumeration. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.32, n.5, p.731-734, 1976.
133. McALISTER, L.; FINKELSTEIN, D.B. Heat shock and thermal resistance in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.93, p.819-824, 1980.
134. McCLEERY, D.R.; ROWE, M.T. Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, n.4, p.252-256, 1995.
135. McDONALD, L.C.; HACKNEY, C.R.; RAY, B. Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, n.2, p.360-365, 1983.
136. MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.5, p.179-185, 1994.
137. MEYER, D.H.; DONNELLY, C.W. Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.8, p.579-582, 1992.

138. MERMELSTEIN, N.H. Controlling *E.coli* O157:H7 in meat. **Food Technology**, Chicago, v.47, n.4, p.90-91, 1993
139. MILLER, L.G.; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.6, p.460-464, 1994.
140. MIYAKE, T.; ARAKI, S.; TSUCHIDO, T. Synthesis and sedimentation of a subset of 15-kDa heat shock proteins in *Escherichia coli* cells from sublethal heat stress. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, Tokyo, v.57, n.4, p.578-583, 1993.
141. MOLENDIA, J.R. *Escherichia coli* (including O157:H7): an environmental health perspective. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.14, n.12, p.742-747, 1994.
142. MONTVILLE, T.J.; CONWAY, L.K. Oxidation-reduction potentials of canned foods and their ability to support *Clostridium botulinum* toxigenesis. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.6, p.1879-1882, 1982.
143. MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. Foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157:H7 - North Dakota, 1990. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.12, n.2, p.81, 1992.
144. MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. 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**, Washington, v.45, n.44, p.975, 1996.

145. MORGAN, G.M.; NEWMAN, C.; PALMER, S.R. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *E. coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.101, p.83-91, 1988.
146. MORGAN, G.M.; NEWMAN, C.; HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with consumption of yoghurt. **Epidemiological Infection**, v.111, p.181-187, 1993.
147. MORRIS, J.G. Oxygen and the obligate anaerobe. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.40, n.3, p.229-244, 1976.
148. MURANO, E.A.; PIERSON, M.D. Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.3, p.171-175, 1992.
149. MURANO, E.A.; PIERSON, M.D. Effect of heat shock and incubation atmosphere on injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.7, p.568-572, 1993.
150. NEWLAND, J.W.; STROCKBINE, N.A.; NEILL, R.J. Cloning of genes for production of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II. **Infection and Immunity**, Washington, v.55, n.11, p.2675-2680, 1987.
151. NGUYEN-THE, C.; LUND, B.M. The lethal effect of carrot on *Listeria* species. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, n.6, p.479-488, 1991.
152. O'BRIEN, A.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiological Reviews**, v.51, p.206-220, 1987.

153. O'BRIEN, A.; LIVELY, T.A.; CHEN, M.E.; ROTHMAN, S.W.; FORMAL, S.B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin. (Letter). **The Lancet**, London, v.1, n.8326, p.702, 1983.
154. ÖZBAS, Z.Y.; VURAL, H.; AYTAC, S.A. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on the growth of spoilage and inoculated pathogenic bacteria on fresh poultry. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung**, Berlin, v.203, p.326-332, 1996.
155. PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.7, p.555-565, 1992.
156. PADHYE, N.V.; KITTELL, F.B.; DOYLE, M.P. Purification and physicochemical properties of a unique vero cell cytotoxin from *E. coli* O157:H7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.139, p.424-430, 1986.
157. PATON, A.W.; RATCLIFF, R.M.; DOYLE, R.M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANSER, J.A.; PATON, J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.7, p.1622-1627, 1996.
158. PAVIA, A.T.; NICHOLS, C.R.; GREEN, D.P.; MOTTICE, S.; GREENE, K.D.; WELLS, J.G.; SIEGLER, R.L.; BREWER, E.D.; HANNON, D.; BLAKE, P.A. Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.116, n.4, p.544-551, 1990.

159. PECK, M.W.; LUND, B.M.; FAIRBAIRN, D.A.; KASPERSSON, A.S.; UNDELAND P.C. Effect of heat treatment on survival of, and growth from, spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* at refrigeration temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.5, p.1780-1785, 1995.
160. PEDERSON, G.S.; FISHER, P. The bactericidal action of cabbage and other vegetable juices. **Bulletin of the New York State Agricultural Experiment Station**, Geneva, v.273, p.1-32, 1944.
161. PHEBUS, R.K.; THIPPAREDDI, H.; KONE, K.; FUNG, D.Y.C.; KASTNER, C.L. Use of Oxyrase™ enzyme in enrichments to enhance the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from culture media and ground beef. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.1, p.249-259, 1993.
162. PLESOFKY-VIG, N.; BRAMBL, R. Heat shock response of *Neurospora crassa*: protein synthesis and induced thermotolerance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.162, n.3, p.1083-1091, 1985.
163. QUINTAVALLA, S.; CAMPANINI, M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, n.5, p.184-187, 1991.
164. RAGHUBEER, E.V.; JIM, S.K.E.; MICHAEL, L.C.; MEYER, R.S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.1, p.13-18, 1995.
165. RAGHUBEER, E.V.; MATCHES, J.R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, n.4, p.803-805, 1990.

166. RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R.; BEZANSON, G.S.; KASATIYA, S.;  
Characterization of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical  
Microbiology**, Washington, v.26, n.10, p.2006-2012, 1988.
167. RAY, B. **Injured index and pathogenic bacteria**: occurrence and detection in  
foods, water and feeds. Boca Raton: CRC Press, 1989. 231p.
168. RAY, B. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **ASM News**,  
Washington, v.59, n.6, p.285-291, 1993.
169. RAY, B.; SPECK, M.L. Plating procedure for the enumeration of coliforms from  
dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,  
v.35, n.4, p.820-822, 1978.
170. RICE, E. Drinking water associated with waterborne disease: hemorrhagic  
colitis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.13, n.10,  
p.603, 1993.
171. RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.;  
DAVIS, B.R.; HERBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.;  
HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis  
associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of  
Medicine**, Waltham, v.308, n.12, p.681-685, 1983.
172. ROSE, P.E.; CLARK, A.J.B. Haematology of the haemolytic uraemic  
syndrome. **Blood**, New York, v.3, p.136-140, 1989.
173. ROWE, P.C.; WALOP, W.; LIOR, H.; MACKENZIE, A.M. Hemolytic anemia  
after childhood *E. coli* O157:H7 infection: are females at increased risk?  
**Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.106, p.523-530, 1991.

174. SALMON, R.L.; FARRELL, I.D.; HUTCHINSON, J.G.P. A christening party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *E. coli* O157:H7. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.103, p.249-254, 1989.
175. SANDERSON, M.W.; GAY, J.M.; HANCOCK, D.D.; GAY, C.C.; FOX, L.K.; BESSER, T.E. Sensitivity of bacteriological culture for detection of *E. coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.10, p.2616-2619, 1995.
176. SCHOENI, J.L.; DOYLE, M.P. Variable colonization chickens perorally inoculated with *E. coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.8, p.2958-2962, 1994.
177. SCOTLAND, S.M.; ROWE, B.; SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A.; GROSS, R.J. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.25, p.237-243, 1988.
178. SCOTLAND, S.M.; WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R. Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.99, p.613-624, 1987.
179. SEMANCHEK, J.; GOLDEN, D. Heat inactivation and injury of *E. coli* O157:H7 cultured at 10 and 37°C. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, p.52, 1996. Supplement,
180. SERNOWSKI, L.P.; INGHAM, S.C. Low specificity of the HEC O157<sup>TM</sup> ELISA in screening ground beef for *E. coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.7, p.545-547, 1992.

181. SHAMSUZZAMAN, K.; CHUAQUI-OFFERMANN, N.; LUCHT, L.; McDOUGALL, T.; BORSA, J. Microbiological and other characteristics of chicken breast meat following electron-beam and sous-vide treatments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.7, p.528-533, 1992.
182. SHERMAN, P.; SONI, R.; PETRIC, M.; KARMALI, M. Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *E. coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, Washington, v.55, n.8, p.1824-1829, 1987.
183. SHINJI, Y.; TATSUO, Y. *Escherichia coli* enterohemorrhagic O157. **Clinical Microbiology**, Tokyo, v.23, n.12, p.781-784, 1996.
184. SILVA, N. (Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil) Comunicação pessoal, 1997.
185. SMITH, H.R. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7: cause for concern. **SGM Quartely**, p.54-55, May, 1997.
186. SMOOT, L.A.; PIERSON, M.D. Effect of oxidation-reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.3, p.700-704, 1979.
187. SNYDER Jr., O.P. Redox potential in deli foods: botulism risk? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.16, n.9, p.546-548, 1996.
188. SNYDER Jr., O.P.; JUNEJA, K.; MARMER, B.S. Thermal inactivation of *E. coli* O157:H7 in meat. **Jornal of Food Protection**, Ames, v.59, p.54, 1996. Supplement.

189. SPECTOR, M.P.; ALIABADI, Z.; GONZALEZ, T.; FOSTER, J.W. Global control in *Salmonella typhimurium*: two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-, anaerobiosis-, and heat-shock-inducible proteins. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.168, n.1, p.420-424, 1986.
190. SPLITTSTOESSER, D.F.; MCLELLAN, M.R.; CHUREY, J.J. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.3, p.226-229, 1995.
191. STEWART, P.J.; DESORMEAUX, W.; CHÉNE, J. Hemorrhagic colitis in a home for the aged-Ontario. **Canadian Disease Weekly Report**, v.9, p.29-32, 1983.
192. STREIPS, U.N.; POLIO, F.W. Heat-shock proteins in bacilli. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.162, n.1, p.434-437, 1985.
193. STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.; NEWLAND, J.Q.; SMITH, H.W.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. The toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infection and Immunity**, Washington, v.53, n.1, p.135-140, 1986.
194. STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**. New York: Academic Press, 1965. 236p.
195. SWERDLOW, D.L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C.; GRIFFIN, P.M.; TIPPEN, S.; DONNELL Jr., H.D.; GELDREICH, E.; PAYNE, B.J.; MEYER Jr., A.; WELLS, J.G.; GREENE, K.D.; BRIGHT, M.; BEAN, N.H.; BLAKE, P.A. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annual Internal Medicine**, v.117, n.10, p.812-819, 1992.

196. TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in the western United State. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.13, n.10, p.592, 1993.
197. TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: overview of clinical and epidemiological issues. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.7, p.632-636, 1994.
198. TARR, P.I.; NEILL, M.A.; ALLEN, J.; SICCARDI, C.J.; WATKINS, S.L.; HICKMAN, R.O. The increasing incidence of the hemolytic-uremic syndrome in King County, Washington: lack of evidence for ascertainment bias. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.129, p.582-586, 1989.
199. TESH, V.L.; O'BRIEN, A.D. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. **Molecular Microbiology**, Salem, v.5, p.1817-1822, 1991.
200. THAYER, D.W.; BOYD, G. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.4, p.1030-1034, 1993.
201. THIPPAREDDI, H.; RETZLAFF, D.; PHEBUS, R.K.; FUNG, D.Y.C. Acid and heat tolerance of acid habituated *Escherichia coli* O157:H7. ANNUAL MEETING OF IAMFES, 83., 1996. Seattle. **Abstract**. Ames: IAMFES, 1996. p.146.
202. THOMPSON, J.S.; HODGE, D.S.; BORCZYK, A.A. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.10, p.2165-2168, 1990.

203. TILDEN Jr., J.; YOUNG, W.; McNAMARA, A.M; CUSTER, C; BOESEL, B.; LAMBERT-FAIR, M.A.; MAJKOWSKI, J.; VUGIA, D.; WERNER, S.B.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS Jr., J.G. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health**, Washington, v.86, n.8, p.1142-1145, 1996.
204. TODD, E.C.D.; SZABO, R.A.; PETERKIN, P.; SHARPE, A.N.; PARRINGTON, L.; BUNDLE, D.; GIDNEY, M.A.J.; PERRY, M.B. Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.10, p.2536-2540, 1988.
205. TOMLINS, R.J.; VAALER, G.L.; ORDAL, Z.J. Lipid biosynthesis during the recovery of *Salmonella typhimurium* from thermal injury. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.18, n.7, p.1015-1021, 1972.
206. TOTH, I.; COHEN, M.L.; RUMSCHLAG, H.S.; RILEY, L.W.; WHITE, E.H.; CARR, J.H.; BOND, W.W.; WACHSMUTH, I.K. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *E. coli* O157:H7 and genetic derivatives. **Infection and Immunity**, Washington, v.58, n.5, p.1223-1231, 1990.
207. TZIPORI, S.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K.I.; ROBINS BROWNE, R.M.; O'BRIEN, A.D.; LIOR, H.; COHEN, M.L.; SMITHERS, J.; LEVINE, M.M. Role of a 60-medalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. **Infection and Immunity**, Washington, v.55, n.12, p.3117-3125, 1987.

208. TZIPORI, S.; WACHSMUTH, I.K.; CHAPMAN, C.; BIRNER, R.; BRITTINGHAM, J.; JACKSON, C.; HOOG, J. The pathogenesis of haemorrhagic colitis caused by *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.154, p.712-716, 1986.
209. UGBOROGHO, T.O.; INGHAM, S.C. Increased D-values of *Staphylococcus aureus* resulting from anaerobic heating and enumeration of survivors. **Food Microbiology**, London, v.11, n.4, p.275-280, 1994.
210. UPTON, P.; COIA, J.E. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurised milk supply. **The Lancet**, London, v.344, n.8, p.1015, 1994.
211. VAHCIC, B.N.; PALIC, A.; RITZ, M. Mathematical evaluation of relationships between copper, iron, ascorbic acid and redox potential of milk. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.47, n.4, p.228-230, 1992.
212. Van BOGELEN, R.A.; KELLEY, P.M.; NEIDHARDT, F.C. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, n.1, p.26-32, 1987.
213. XAVIER, I.J.; INGHAM, S. Increased D-values for *Salmonella enteritidis* resulting from the use of anaerobic enumeration methods. **Food Microbiology**, London, v.10, n.3, p.223-228, 1993.
214. WADELL, T.; HEAD, S.; PETRIC, M.; COHEN, A.; LINGWOOD, C. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by *Escherichia coli* verocytotoxin 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.152, p.674-679, 1987.

215. WALLECE, J.S.; JONES, K. The use of selective and differential agars in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy herds. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.6, p.663-668, 1996.
216. WANG, G.; DOYLE, M. Survival of *E. coli* O157:H7 in drinking and recreational water. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, p.52, 1996. Supplement.
217. WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; BARK, D.H. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.7, p.629-631, 1994.
218. 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**, Ames, v.58, n.1, p.7-12, 1995.
219. WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K. Laboratory investigation of haemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.18, n.3, p.512-520, 1983.
220. WILLSHAW, G.A.; THIRLWELL, J.; JONES, A.P.; PARRY, S.; SALMON, R.L.; HICKEY, M. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, n.5, p.304-307, 1994.
221. YU, J.; KAPER, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic O157:H7. **Molecular Microbiology**, Salem, v.6, p.411-417, 1992.

222. ZHAO, T.; DOYLE, P.; BESSER, R.E. Fate of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider with and without preservatives. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.13, n.10, p.604, 1993.
223. ZHAO, T.; DOYLE, P.; SHERE, J.; GARBER, L. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.4, p.1290-1293, 1995.