

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DESEMPENHO DA METODOLOGIA PARA ISOLAMENTO  
E CONTAGEM DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM LEITE  
E QUEIJO E SUA OCORRÊNCIA EM QUEIJO MINAS  
FRESCAL PRODUZIDO COMERCIALMENTE

Maria Raquel Manhani

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão  
*Orientador*

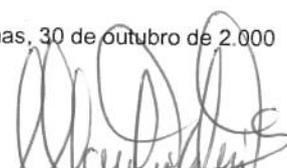
Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de  
Alimentos - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em  
Tecnologia de Alimentos

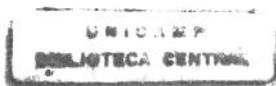
Campinas - SP  
2000

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria Raquel Manhani, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de outubro de 2000.

Campinas, 30 de outubro de 2000

  
Prof. Dr. Mauro Faber de F. Leitão  
Presidente da Banca



81000 2000

UNIDADE	B e
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	M314d
V.	Ex.
TOMBO BC/	43403
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 00,00
DATA	09/10/10
N.º CPD	

CM-00154289-1

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

M314d Manhani, Maria Raquel.  
Desempenho da metodologia para isolamento e contagem de *Escherichia coli* O157:H7 em leite e queijo e sua ocorrência em queijo minas frescal produzido comercialmente / Maria Raquel Manhani. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Mauro Faber de Freitas Leitão  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Escherichia coli*. 2. Leite. 3. Queijo. 4. Metodologia. I. Leitão, Mauro Faber de Freitas. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

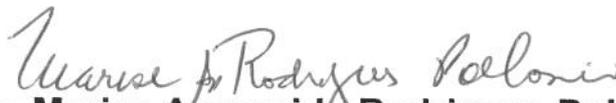
**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão**  
*Presidente*

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Prof. Dr. Domingos da Silva Leite**  
*Membro*



**Profa. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio**  
*Membro*



**Profa. Dra. Mariza Landgraf**  
*Membro*

Campinas, de de 2000.

*O Amor quando se revela*

“O amor, quando se revela,  
Não se sabe revelar,  
Sabe bem olhar p’ra ela,  
Mas não lhe sabe falar.  
Quem quer dizer o que sente  
Não sabe o que há de dizer.  
Fala: parece que mente  
Cala: parece esquecer

Ah, mas se ela adivinhasse,  
Se pudesse ouvir o olhar,  
E se um olhar lhe bastasse  
P’ra saber que a estão a amar!  
Mas quem sente muito, cala;  
Quem dizer quanto sente  
Fica sem alma nem fala,  
Fica só, inteiramente!

Mas se isto puder contar-lhe  
O que não lhe ousou contar,  
Já não terei que falar-lhe  
Porque lhe estou a falar...”

*Fernando Pessoa*

*Ao inesquecível*

*Prof. Dr. António de Melo Serrano*

*A Deus, por ter-me dado*

*José e Aracy, pais admiráveis*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Mauro Faber de Freitas Leitão, pela dedicação, orientação e carinho;

Ao Prof. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pelo grande incentivo, pelas sugestões e amizade ao longo de todos esses anos;

À Profa. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio, pela amizade e força, pelas sugestões e correções deste trabalho;

À Profa. Mariza Landgraf, pelas sugestões e correções deste trabalho;

Ao Prof. Domingos da Silva Leite, pelos primeiros ensinamentos sobre *Escherichia coli* O157:H7 e pelas sugestões e correções deste trabalho;

À Profa. Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, pela amizade, apoio e sugestões;

A Alex Souza, pela realização dos testes de polimerase em cadeia - PCR para caracterização da cepa de *E. coli* O157:H7 utilizada neste trabalho;

À minha irmã Andréia, meu cunhado e amigo Luiz, que sempre me incentivaram;

Ao meu amado sobrinho Guilherme, que na sua inocência, não sabe o quanto me faz feliz;

À minha amiga e companheira Dirce Yorika Kabuki, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e colaboração;

À Jacinta Rodrigues de Oliveira Franco, pelos cuidados e atenção de mãe, incentivo e colaboração;

A José Cardoso, pela amizade e grande ajuda na análise estatística dos dados;

À Neliane Silveira, pelos ensinamentos sobre *E. coli* O157:H7;

Aos amigos Maria Helena, Valéria, Magaly, Raquel, Ernani, Graziela, Ana Paola, Alaíse, Afonso, Ângela, Daniel, Isabela, Pedro Cornejo, Vanessa, Heliana, Edmar, Ana Lúcia, Maria Carla, Pedro Marinho, Ivan, Celina, Cristina e Elaine, pela força e harmoniosa convivência no Laboratório de Higiene;

À Maria Lúcia, Ana Lourdes, Cida, Rosinha, Ana Koon, Mara, Judite, Ana Maria e Luciana Taba, pela amizade e apoio;

Ao Luís, Rosely, Ivao (Paulinho), Antonio Marcolino, Karina, Tânia, José Eduardo, Fernando e Lílian pela amizade e força;

Às amigas Rosana, Luciana, Meire e Liliane, sempre presentes em minha vida;

Aos professores, amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA - UNICAMP;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas por possibilitar a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro (Proc. 97/05454-5);

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

**Muito obrigada!**

## ÍNDICE

ÍNDICE GERAL .....	i
ÍNDICE DE TABELAS .....	iii
RESUMO .....	v
SUMMARY .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1. O microrganismo e suas toxinas .....	4
3.2. A doença no homem .....	8
3.3. Características bioquímicas e comportamento frente a fatores intrínsecos e extrínsecos .....	9
3.4. Dados epidemiológicos de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	13
3.5. Métodos de isolamento de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	17
3.6. Condições higiênico-sanitárias do leite e do queijo tipo Minas frescal .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1. Material .....	32
4.1.1. Amostras .....	32
4.1.2. Meios de cultura .....	33
4.1.3. Reagentes .....	35
4.1.4. Outros .....	35
4.2. Métodos .....	36
4.2.1. Teste de resistência de <i>E. coli</i> O157:H7 à novobiocina .....	36
4.2.2. Comportamento de <i>E. coli</i> O157:H7 e da microbiota de queijo Minas frescal frente à associação de antibióticos .....	37
4.2.3. Avaliação da técnica de contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru e de queijo Minas frescal .....	38

4.2.4. Avaliação do efeito da suplementação de meios seletivos com cefixima e telurito de potássio na contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite e de queijo Minas frescal.....	39
4.2.5. Avaliação da técnica do Número Mais Provável (NMP) na contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal.....	40
4.2.6. Avaliação de técnicas de detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite e de queijo Minas frescal .....	40
4.2.7. Avaliação da sensibilidade do sistema TECRA <i>E. COLI</i> VIA e dos métodos de Okrend & Rose (1995) e do FDA (1998) na detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal.....	42
4.2.8. Ocorrência de <i>E. coli</i> O157:H7 em amostras comerciais .....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.	Características bioquímicas de <i>E. coli</i> .....	9
TABELA 2.	Datas de fabricação e de validade das amostras de queijo minas frescal registradas no Ministério da Agricultura.....	33
TABELA 3.	Caldo TSB com diferentes concentrações de novobiocina.....	36
TABELA 4.	Caldo TSB suplementado com diferentes concentrações de vancomicina, cefsulodina e cefixima.....	37
TABELA 5.	Comportamento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a várias concentrações de novobiocina.....	45
TABELA 6.	Comportamento de <i>E. coli</i> O157:H7 e da microbiota natural de queijo Minas frescal frente à ação conjunta de três antibióticos, em diferentes concentrações.....	47
TABELA 7.	Contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo tipo Minas frescal tratadas a 80°C/5min e recuperação do inóculo.....	50
TABELA 8.	Contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru e recuperação do inóculo inicial.....	51
TABELA 9.	Contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite tratado termicamente (68°C/2min) em diferentes meios de cultura suplementados com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio, e recuperação do inóculo inicial.....	53
TABELA 10.	Uso da técnica do Número Mais Provável (NMP) na contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras tratadas termicamente de queijo Minas frescal.....	54

<b>TABELA 11.</b>	Recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo tratadas termicamente (80° C/5min), em função do meio de enriquecimento e do ágar seletivo de isolamento.....	56
<b>TABELA 12.</b>	Recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo não submetidas a tratamento térmico, em função do meio de enriquecimento e do ágar seletivo de isolamento.....	57
<b>TABELA 13.</b>	Recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite submetidas a tratamento térmico (68° C/2min), em função do meio de enriquecimento e do ágar seletivo de isolamento.....	59
<b>TABELA 14.</b>	Recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru, em função do meio de enriquecimento e do ágar seletivo de isolamento.....	60
<b>TABELA 15.</b>	Recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal pasteurizadas, em função do caldo de enriquecimento e do ágar seletivo para isolamento...	63
<b>TABELA 16.</b>	Recuperação de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal sem tratamento térmico, em função do caldo de enriquecimento e do ágar seletivo para isolamento.....	65
<b>TABELA 17.</b>	Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 através dos métodos Okrend <i>et al.</i> (1990), FDA (1998) e sistema TECRA <i>E. COLI</i> O157 VIA em amostras de queijo Minas frescal inoculadas experimentalmente.	68

## RESUMO

A etapa inicial deste trabalho consistiu na avaliação da resistência de uma cepa de *Escherichia coli* O157:H7 e da microbiota contaminante de queijo Minas frescal a antibióticos utilizados para conferir seletividade a meios de isolamento dessa bactéria. Observou-se que *E. coli* O157:H7 mostrou sensibilidade a concentrações de novobiocina superiores a 30 mg/L, sendo desaconselhável o uso de 100 mg/L, conforme preconizado em alguns meios de isolamento. Como o microrganismo mostrou-se menos tolerante à combinação de três antibióticos (cefixima a 0,05 mg/L, cefsulodina a 10 mg/L e vancomicina a 8 mg/L) do que a microbiota contaminante do queijo frescal, tornou-se questionável a indicação do uso desses antibióticos para conferir seletividade aos meios de isolamento da bactéria. Em outra etapa foram avaliados os meios seletivos MacConkey sorbitol modificado, HC de acordo com Szabo *et al.* (1986), Rainbow O157, EMB modificado e SD39 modificado, suplementados ou não com cefixima (0,05 mg/L) e telurito de potássio (2,5 mg/L), na contagem de *E. coli* O157:H7, inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal e de leite, submetidas ou não a tratamento térmico. Os resultados revelaram a inadequação de todos esses meios nas contagens de amostras apresentando elevada contaminação (sem tratamento térmico). Nas amostras com contaminação baixa (tratadas termicamente), os meios HC e SD39 modificado, ambos suplementados, revelaram desempenho superior na análise de queijo (95,9 e 95,0 % de recuperação, respectivamente). Na análise de leite, o HC foi o mais eficiente, levando a 85,3% de recuperação. A técnica do Número Mais Provável revelou-se deficiente e pouco prática na contagem de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijo, não representando, portanto, uma alternativa recomendável. Na avaliação qualitativa de *E. coli* O157:H7 foram avaliados os enriquecimentos em caldo BPW + 3 antibióticos, segundo Blanco *et al.* (1996), em meio mEC+n segundo Okrend & Rose (1989), em meio mTSB segundo Padhye & Doyle (1991), além do método proposto pelo FDA (1998) e o método imunoenzimático TECRA<sup>®</sup>. Na análise de amostras de queijo Minas frescal inoculadas experimentalmente,

nenhum dos sistemas revelou desempenho altamente satisfatório. No entanto, entre as metodologias clássicas testadas, a do FDA mostrou-se superior, enquanto o método TECRA<sup>®</sup> foi aquele que, comparativamente, possibilitou a maior porcentagem de isolamentos e menor índice de resultados falso-negativos. Na análise de 60 amostras de queijo Minas frescal, submetidas ou não a inspeção federal, nenhuma delas revelou a presença de *E. coli* O157:H7. Os resultados obtidos indicaram a necessidade de se aperfeiçoar a metodologia para a pesquisa deste patógeno em alimentos, principalmente naqueles cuja microbiota contaminante apresenta-se em números elevados.

## SUMMARY

In a first experiment, it was evaluated the tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 and natural contaminants found in Minas frescal cheese to antibiotics used in selective culture media. It was noticed that *E. coli* O157:H7 exhibited low tolerance to novobiocin concentrations above 30 mg/L, although the use of 100 mg/L is indicated in some isolation media. The microorganism was less tolerant to antibiotic combination (cefixime at 0,05 mg/L, cefsulodin at 10 mg/L and vancomycin at 8 mg/L) when compared to the natural contaminant cheese microflora what could be a drawback concerning the use of these agents in selective culture media. In a second experiment, the selective media MacConkey sorbitol (modified), HC according to Szabo (1990), Rainbow O157, modified EMB and modified SD39, supplemented or not with cefixime (0,05 mg/L) and potassium telurite (2,5 mg/L) were evaluated for *E. coli* O157:H7 counting, with the bacterium inoculated in Minas frescal cheese and milk samples, both submitted or not to thermal treatment. All the tested media were inadequate when used for bacterial counts in the samples with high natural contamination (without thermal treatment). However, when the cheese samples with lower contamination were analyzed, the media HC and modified SD39, both supplemented, showed superior performance (95,9 and 95,0% recovery, respectively). In milk analysis, HC medium was the most efficient (85,3% recovery). The Most Probable Number technique showed an inadequate performance for *E. coli* O157:H7 counts. For the qualitative evaluation of *E. coli* O157:H7 it was evaluated BPW+3 antibiotics broth according to Blanco *et al.* (1996), mEC+n (Okrend & Rose, 1989), mTSB (Padhye & Doyle, 1991), FDA proposed method (1998) and the immunoenzimatic method TECRA<sup>®</sup>. None of the tested methods showed superior performance for *E. coli* O157:H7 recovery in inoculated cheese samples in the presence of the natural microflora. However the FDA method was the most efficient among the classical ones, while the TECRA<sup>®</sup> assay was the best concerning *E. coli* O157:H7 recovery and no false negative results. The results suggest the need for improvement in the methodology for *E. coli* O157:H7 recovery mainly in foods with high contamination level.

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* O157:H7 tem sido identificada como um patógeno emergente em diferentes alimentos de origem animal, sendo o gado bovino um dos principais veículos desta bactéria. Ela é altamente infecciosa e pode causar doenças graves no homem, sendo a síndrome urêmica hemolítica (HUS) a mais importante causa de deficiência renal aguda em crianças, enquanto que a púrpura trombocitopênica trombótica geralmente acomete idosos, acarretando o aparecimento de coágulos de sangue no cérebro destes indivíduos.

Levantamentos epidemiológicos em vários países têm revelado que o leite cru é um veículo importante na disseminação de *E. coli* O157:H7, sendo que o aquecimento adequado e sua pasteurização são métodos eficientes para a destruição desta bactéria. No entanto, este microrganismo permanece como um risco potencial na contaminação de produtos lácteos, seja pela sua capacidade de permanecer viável por longos períodos em ambientes ácidos, bem como pela possibilidade de contaminações cruzadas ao longo do processamento.

Até o momento, poucas são as pesquisas sobre a incidência deste microrganismo em produtos lácteos, bem como em relação à metodologia adequada para a sua detecção ou contagem. Os métodos propostos geralmente baseiam-se no fato de que *E. coli* O157:H7 não fermenta sorbitol, não produz a enzima  $\beta$ -glucuronidase e não apresenta bom crescimento a temperaturas acima de 44°C.

Em função destas características, vários meios de cultura e técnicas de isolamento e detecção vêm sendo pesquisados, muitos deles carecendo ainda de melhor avaliação de desempenho. Além disso, métodos imunoenzimáticos também vêm sendo desenvolvidos, havendo, portanto, diferentes metodologias alternativas para a pesquisa desta bactéria.

Em nosso meio, são ainda bastante restritos os trabalhos voltados para a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em alimentos, principalmente em produtos lácteos.

Sabe-se que nem sempre as condições higiênico-sanitárias de processamento e manipulação destes produtos são adequadas, particularmente no caso de queijos tipo Minas frescal.

Assim sendo, esta pesquisa foi desenvolvida procurando avaliar o desempenho de métodos alternativos para contagem e isolamento de *E. coli* O157:H7 em leite e derivados e estudar sua ocorrência em queijo do tipo Minas frescal.

## 2. OBJETIVOS

- 2.1. Avaliação da resistência de *E. coli* O157:H7 (cepa fornecida pelo Instituto Oswaldo Cruz) e da microbiota contaminante de queijo Minas frescal a antibióticos utilizados para conferir seletividade a meios de isolamento.
- 2.2. Análise do desempenho de diferentes procedimentos e meios seletivos de cultura na contagem ou detecção da cepa de *E. coli* O157:H7, citada no item acima, inoculada experimentalmente em leite e queijo tipo Minas frescal.
- 2.3. Influência da microbiota contaminante do leite cru e queijo Minas frescal no isolamento da cepa de *E. coli* O157:H7 em estudo inoculada experimentalmente.
- 2.4. Avaliação comparativa de um método imunoenzimático frente aos métodos culturais clássicos para detecção de *E. coli* O157:H7.
- 2.5. Avaliação da ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras comerciais de queijo Minas frescal de diferentes procedências.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O Microrganismo e suas Toxinas

*Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez por Escherich, em 1885 (Padhye & Doyle, 1992; Molenda, 1994; Madigan *et al.*, 1997), pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, a qual é constituída por mais de vinte gêneros. *E. coli* é incluída no grupo dos coliformes, os quais se caracterizam como bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, que fermentam lactose com produção de ácido e gás em 48 h a 35°C (Molenda, 1994).

*E. coli* faz parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, sendo que geralmente as cepas que colonizam o intestino humano são meros comensais. No entanto, algumas cepas são patogênicas (Padhye & Doyle, 1992; Madigan *et al.*, 1997). As infecções causadas por *E. coli* em humanos podem ser divididas em duas grandes categorias: infecções intestinais, também chamadas diarréicas e infecções extra-intestinais, incluindo doenças do trato urinário, meningite em recém-nascidos e septicemia (Molenda, 1994).

As cepas de *E. coli* diarréica que têm sido associadas com doenças de origem alimentar são agrupadas em cinco categorias, com base nas propriedades de virulência, patologias e características sorológicas distintas (Padhye & Doyle, 1992; Molenda, 1994; Madigan *et al.*, 1997):

*E. coli* enteropatogênica (EPEC) é causadora de diarréia infantil em recém-nascidos. Muitos adultos são portadores de EPEC, mas raramente apresentam sintomas da doença (Russel & Taylor citados por Ormenese *et al.*, 1999). Algumas linhagens de EPEC produzem toxinas, particularmente verotoxinas, enquanto outras invadem células epiteliais (Padhye & Doyle, 1992).

As estirpes enteroinvasivas (EIEC) são muito similares às shigelas. Estes organismos invadem as células epiteliais do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta (disenteria). A capacidade de invasão das EIEC está relacionada com a presença de um grande plasmídeo de 140 MDa (Padhye & Doyle, 1992; Ormenese *et al.*, 1999).

*E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) causam diarreia aquosa devido à adesão às células do epitélio intestinal e subsequente produção de uma ou mais enterotoxinas termolábeis (LT1 e LT2) ou termoestáveis (STa e STb). ETEC provoca a chamada "diarreia dos viajantes" (Padhye & Doyle, 1992; Ormenese *et al.*, 1999).

Cepas de *E. coli* enteroaderentes ou enteroagregativas (EAEC) têm a capacidade de se aderirem às células Hep-2 (linhagem de células epiteliais de ratos). O termo enteroaderente foi proposto por Mathewson e colaboradores em 1983 para descrever cepas de *E. coli* diferentes de EPEC e de ETEC (Molenda, 1994). Essas linhagens são produtoras de toxina termoestável e causam diarreia aquosa através de mecanismo ainda não conhecido. Autópsias em crianças contaminadas por esta bactéria mostraram lesões destrutivas do íleo (Ormenese *et al.*, 1999).

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC), a qual inclui *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O26:H11, foi isolada pela primeira vez em 1975 de uma mulher na Califórnia acometida de diarreia sanguinolenta (Padhye & Doyle, 1992). *E. coli* O157:H7 assemelha-se muito à *E. coli* O55:H7, uma linhagem enteropatogênica que causa diarreia e muito disseminada em crianças (Mead & Griffin, 1998). Segundo Whittam (1996) citado por Sheridan & McDowell (1998), o ancestral O55:H7 era muito provavelmente uma *E. coli* enteropatogênica, a qual adquiriu genes citotóxicos de *Shigella dysenteriae* tipo I como resultado de uma infecção por um fago e subsequente transferência dos genes de toxina Shiga durante a transdução. Esses fagos estão amplamente disseminados na natureza e podem

ligar-se a um grande número de bactérias entéricas, entre elas, *Citrobacter freundii*, considerado um patógeno emergente.

O mecanismo pelo qual *E. coli* O157:H7 provoca doenças não foi ainda totalmente esclarecido; no entanto, vários fatores têm sido associados com a virulência deste organismo. Um deles é a produção de uma ou mais verotoxinas. Este patógeno produz altos níveis de uma citotoxina ativa contra células Vero, linhagem de células obtidas de rim de macaco verde africano. Na *E. coli* O157:H7 a verotoxina (VT) é imunologicamente indistinguível da toxina Shiga e é também idêntica quanto às atividades biológicas, ou seja citotoxicidade a células HeLa, letalidade em camundongos e enterotoxicidade observada em alça ligada de coelhos. Devido a estas similaridades, o termo toxina "Shiga-like" (SLT) é utilizado para descrever a referida toxina, a qual é denominada STI ou VT1.

Outra VT produzida por *E. coli* O157:H7 é antigenicamente diferente da VT1, não é neutralizada por antitoxina Shiga e recebe a denominação STII ou VT2. Esta toxina é uma molécula mais divergente com somente 56% de aminoácidos homólogos à toxina VT1. A maioria das linhagens de *E. coli* O157:H7 produz VT2. A porcentagem que também produz VT1 varia, dependendo do local ou região do isolamento (< 25% em culturas isoladas na Europa a > 80% das isoladas na América do Norte e Japão) (Mead & Griffin, 1998).

Ambas as toxinas são compostas de 5 subunidades B e uma subunidade A simples e são codificadas por um bacteriófago inserido no cromossomo da *E. coli* O157. A subunidade B liga-se à globotriaosilceramida (Gb3), um glicolípido de função desconhecida encontrado em vários níveis nas membranas das células eucarióticas. Após a endocitose, a subunidade A inativa enzimaticamente a subunidade ribossômica 60S, bloqueando assim a síntese protéica (Mead & Griffin, 1998).

A produção de toxinas Shiga não é suficiente para causar a doença. Outros fatores que contribuem para a virulência de *E. coli* O157 incluem a presença de

um plasmídio de virulência de 60 MDa (pO157) e o “locus” de “effacement” do eritrócito (LEE). O plasmídio de 60 MDa codifica uma hemolisina que, associada a sistemas de transporte especializados, pode permitir que *E. coli* O157 utilize o sangue do intestino como fonte de ferro (Mead & Griffin, 1998).

As toxinas Shiga têm efeitos local e sistêmico no intestino e são provavelmente críticas ao desenvolvimento da diarreia sanguinolenta. Alterações histopatológicas, associadas à infecção, incluem hemorragia e edema na lâmina própria com áreas de necrose superficial. Acredita-se que HUS pós-diarreica é primariamente uma doença da microvasculatura que se desenvolve quando as toxinas Shiga, produzidas no intestino, entram no sangue e ligam-se às células endoteliais, mediada pelas toxinas Shiga, pode desencadear-se a deposição de fibrina, levando à injúria de eritrócitos circulantes (hemólise) e oclusão da microvasculatura renal (falência renal) (Mead & Griffin, 1998).

Uma terceira citotoxina que tem efeito sobre células Vero, um polipeptídeo de 64 KDa purificado a partir de uma cepa de *E. coli* O157:H7, apresenta ponto isoelétrico de 5,2 e não possui subunidades dissulfeto ligadas, segundo resultados de eletroforese em gel. Esta toxina não é neutralizada por antissoro contra toxina Shiga (Padhye & Doyle, 1992).

A adesão de *E. coli* O157:H7 às células intestinais pode ser um importante aspecto do potencial patogênico deste microrganismo. Pacientes acometidos por infecção por *E. coli* O157:H7 não apresentam ou têm pouca febre, sugerindo que este microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema circulatório. Tudo leva a crer que a bactéria coloniza o trato intestinal, onde elabora suas toxinas, as quais posteriormente atuam sobre o cólon (Padhye & Doyle, 1992). A maioria das *E. coli* O157:H7 possui um plasmídio de 60 MDa, responsável pela aderência às células do intestino (Padhye & Doyle, 1992).

### 3.2. A Doença no Homem

Três principais manifestações de doença têm sido atribuídas à *E. coli* O157:H7: colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombocitopênica trombótica (Doyle, 1991; Padhye & Doyle, 1992; Mead & Griffin, 1998).

As características da colite hemorrágica são o aparecimento súbito de dores abdominais, seguidas por diarréia aquosa que persiste por 24 horas e posteriormente se torna sanguinolenta. Pode ocorrer vômito, porém febre é rara. O período de incubação varia de 3 a 9 dias, com média de 4 dias (Padhye & Doyle, 1992). Alguns autores sugerem que o longo período de incubação é consequência de uma dose infecciosa pequena (Riley, 1987; Sivelä, 1995).

Em um surto ocorrido no Reino Unido, pode-se estimar que o Número Mais Provável (NMP) de *E. coli* O157:H7 no alimento incriminado foi inferior a 2 organismos em 25 g de amostra analisada. Acredita-se que apenas 10 organismos são necessários para que ocorra a infecção (Sivelä, 1995).

Em alguns casos, um exame radiológico do paciente pode revelar uma aparência de um pseudo tumor no cólon. A doença se distingue da disenteria descrita em shigeloses ou gastroenterite causada por EIEC devido à ausência de febre.

A síndrome urêmica hemolítica (HUS) é a mais importante causa de deficiência renal aguda em crianças. Ela envolve anemia hemolítica, trombocitopenia e deficiência renal. Normalmente, as pessoas que adquirem HUS necessitam de diálise e transfusão de sangue (Padhye & Doyle, 1992, Mead & Griffin, 1998).

Púrpura trombocitopênica trombótica é similar à HUS, exceto que na primeira há o comprometimento do sistema nervoso central. Esta síndrome ocorre geralmente em idosos e consiste de anemia hemolítica microangiopática,

trombocitopenia profunda, sinais neurológicos oscilantes, febre e azotemia. Frequentemente desenvolvem-se coágulos de sangue no cérebro e morte (Riley, 1987; Padhye & Doyle, 1992).

Outras complicações clínicas associadas com infecção causada por *E. coli* O157:H7 incluem cistite hemorrágica, convulsões e anemia (Riley, 1987; Padhye & Doyle, 1992).

### 3.3. Características bioquímicas e comportamento frente a fatores intrínsecos e extrínsecos

Cepas de *E. coli* O157:H7 possuem características bioquímicas semelhantes às da maioria das *E. coli*, como pode ser verificado na Tabela 1.

**TABELA 1.** Características bioquímicas de *E. coli*

Teste	Reação
redução de nitrato	+
fermentação de manitol	+
fermentação de lactose	+
utilização de malonato	-
produção de H <sub>2</sub> S	-
produção de uréase	-
utilização de citrato	-
reação de Voges-Proskauer	-
produção de indol	+
fermentação de glucose com produção gás	+
produção de lisina descarboxilase	+
reação de vermelho de metila	+

Fonte: FDA (1984)

Diferenças nas propriedades bioquímicas incluem ausência de fermentação de sorbitol, ausência de atividade da  $\beta$ -glucuronidase e produção de

enterohemolisina. Mais de 90% dos isolados de *E. coli* de origem humana fermentam sorbitol em 24 horas, ao passo que *E. coli* O157:H7 não fermenta este álcool (Doyle, 1991; Sivelä, 1995; Armstrong *et al.*, 1996). Uma percentagem superior a 90% das cepas de *E. coli* produz a enzima  $\beta$ -glucuronidase, a qual é a base para um ensaio rápido fluorogênico para *E. coli*. O indicador 4-metil-umbeliferil glucoronídeo (MUG) utilizado neste teste é hidrolisado pela  $\beta$ -glucuronidase resultando em um produto fluorogênico. As cepas de *E. coli* O157:H7 não produzem esta enzima.

Beutin e colaboradores, citados por Doyle (1991), descreveram um novo tipo de hemolisina, denominado enterohemolisina, que pode ser detectada somente em placas de sangue contendo eritrócitos lavados. De acordo com os autores, a maioria das cepas de *E. coli* O157:H7 produz enterohemolisina, enquanto que outras cepas de *E. coli* não são capazes de fazê-lo.

As cepas de *E. coli* O157:H7 descarboxilam ornitina e lisina (Haldane *et al.*, 1986).

Uma outra importante diferença de *E. coli* O157:H7 está na sua incapacidade de se multiplicar em temperaturas entre 44° e 45,5°C (Riley, 1987; Doyle, 1991; Sivelä, 1995), faixa de temperatura utilizada geralmente nos procedimentos de detecção de coliformes fecais e subseqüentemente de *E. coli* em alimentos (Padhye & Doyle, 1992).

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

Segundo Sivelä (1995) a faixa de temperatura utilizada para recuperação de *E. coli* O157:H7 varia de 35 a 43°C. Estudos de crescimento em caldo triptona soja (TSB) revelaram que este organismo tem ótimo crescimento entre 30 e 42°C,

com tempos de geração variando de 0,49 horas a 37°C a 0,64 horas a 42°C (Padhye & Doyle, 1992).

Apesar de vários surtos de infecção por *E. coli* O157:H7 estarem relacionados com o consumo de carne moída, estudos de inativação térmica revelaram que este microrganismo não possui grande resistência ao calor.

Os valores D de *Escherichia coli* O157:H7 a 57,2; 60; 62,8 e 64,3°C são iguais a 270, 45, 24 e 9,6 segundos respectivamente (Doyle, 1991; Meng et al., 1994), sendo que a pasteurização do leite destrói mais do que  $10^4$  células de *E. coli* O157:H7 por mililitro, isto é, tem efeito letal de, no mínimo, 4D (Doyle, 1991; Sivelä, 1994).

A pasteurização inadequada ou a contaminação pós pasteurização são fatores importantes para a infecção por *E. coli* O157:H7 pelo consumo de leite pasteurizado (Wang, Zhao & Doyle, 1997).

O congelamento de carne moída realizado a -80 e a -20°C não causou alteração significativa no número de células de *E. coli* O157:H7 em um período de 9 meses (Doyle, 1991).

Muitas pesquisas têm mostrado que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em diferentes alimentos a pH 4,5 por mais de 2 meses e a pH 3,6 -3,9 de 5 a 7 semanas à temperatura de 5°C (Sivelä, 1995). O mecanismo exato da tolerância de EHEC a este fator intrínseco não foi ainda esclarecido. Alguns pesquisadores supõem que ele seja constitutivo, não sendo induzido pela exposição a ambientes ácidos. Por outro lado, verificou-se que muitas cepas selvagens de EHEC produzem colônias mucóides, com camadas viscosas de exopolissacarídeo. Este fenômeno explicaria, parcialmente, a tolerância a ácidos presentes em alimentos. Além disso, a camada viscosa atuaria como uma barreira de proteção física contra condições ambientais adversas, bloqueando ou dificultando a penetração de

ingredientes com atividade antimicrobiana nas células dos microrganismos (Erickson *et al.*, 1995).

*E. coli* O157:H7 também apresenta-se muito tolerante a altas concentrações de sal e resistente a subprodutos de fermentação (Reitsma & Henning, 1996).

Em alimentos e, em particular, nos produtos lácteos, Saad e colaboradores (1999) avaliaram o potencial de multiplicação de *E. coli* O157:H7 em queijo Minas frescal fabricado por diferentes processamentos e mantido sob refrigeração. As variáveis de processamento incluíram a matéria-prima (leite tipo B pasteurizado ou cru), a adição ou não de cultura láctica e a adição ou não de sal. O monitoramento deste patógeno foi realizado após 1, 2, 7 e 14 dias de armazenamento do produto sob refrigeração, empregando-se Petrifilm Kit-HEC (3M) e ágar Mac Conkey sorbitol no isolamento. Observou-se que nas primeiras 24 horas houve um aumento de 0,5 a 2 ciclos log no número de células de *E. coli* O157:H7, e que este manteve-se constante durante todo o período de armazenamento subsequente sob refrigeração, independentemente do tipo de processamento. Esses resultados sugerem que a presença de *E. coli* O157:H7 no leite pode representar um risco no processamento de queijo tipo Minas frescal.

Um estudo realizado por Wang, Zhao & Doyle (1997) teve por finalidade determinar a sobrevivência e as características de crescimento deste patógeno em leite cru (contagem total de  $4,7 \times 10^3$  UFC/mL) e pasteurizado (contagem total de  $2,3 \times 10^1$  UFC/mL) mantido nas temperaturas de 5, 8, 15 e 22°C por até 28 dias. Dois níveis de inóculo ( $10^3$  e  $10^5$  UFC/mL) de uma mistura de 5 linhagens resistentes ao ácido nalidíxico foram utilizados. À temperatura de 5°C, *E. coli* O157:H7 não se desenvolveu e a população diminuiu cerca de 1,5 a 2,0 ciclos log UFC/mL em 28 dias. O crescimento de *E. coli* O157:H7 ocorreu a 8°C, com 1 a 2 ciclos log UFC/mL nos 4 primeiros dias. A população de *E. coli* O157:H7 aumentou aproximadamente de 3 a 5 ciclos log em 3 dias quando mantida a 15°C, sendo que em 3 amostras de leite pasteurizado, este patógeno continuou a se

multiplicar até mais de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL até o sétimo dia, permanecendo constante durante o restante do período de incubação. A 22°C, o pH decresceu rapidamente para menos de 4,0 em 4 dias e o patógeno atingiu valores não detectáveis em cerca de 14 dias. *E. coli* O157:H7 multiplicou-se mais lentamente no leite cru, o qual tinha uma contagem global inicial de bactérias maior do que nos leites pasteurizados, provavelmente devido à atividade antagônica das bactérias pré-existentes. Diante destes resultados, fica evidente que o leite deve ser armazenado a temperaturas  $\leq 5^\circ\text{C}$  para se evitar a multiplicação de *E. coli* O157:H7.

### 3.4. Dados epidemiológicos de *E. coli* O157:H7

A infecção humana por *E. coli* O157:H7 tem sido relatada em mais de 30 países, nos seis continentes. Taxas de incidência anuais de 8 por 100.000 habitantes ou maiores aparecem na Escócia, Canadá e Estados Unidos. Elevadas taxas também são encontradas em regiões da América do Sul, especialmente Argentina, onde a HUS é endêmica e tem uma incidência 5 a 10 vezes maior do que na América do Norte (Mead & Griffin, 1998).

Este microrganismo foi primeiramente identificado como patógeno ao homem em 1982, quando foi associado a dois surtos de enterocolite hemorrágica de origem alimentar relatados nos estados de Oregon (26 casos) e Michigan (21 casos) (Riley *et al.*, 1983). Ambos os surtos estavam relacionados epidemiologicamente à ingestão de sanduíches de carne moída, e *E. coli* O157:H7 foi isolada de uma porção de carne crua moída congelada do mesmo lote de carne implicado em um dos surtos (Wells *et al.*, 1991). Desde então, muitos surtos de infecção por esta bactéria têm sido reportados nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Egito, Japão. No Brasil, não há relatos de doenças causadas por *E. coli* enterohemorrágica.

Em setembro de 1984, um surto por *E. coli* O157:H7 ocorreu em um asilo para idosos nos Estados Unidos. Trinta e quatro dos 101 residentes tiveram

diarréia, 14 foram hospitalizados com dores abdominais severas, distensão abdominal e diarréia sanguinolenta intensa. Houve quatro mortes. O veículo de transmissão foi hambúrguer (Ryan *et al.*, 1986).

Uma grande epidemia ocorreu nos Estados Unidos entre novembro de 1992 e fevereiro de 1993, abrangendo os estados de Washington, Idaho, Califórnia e Nevada. Mais de 500 infecções por *E. coli* O157:H7 foram confirmadas laboratorialmente e quatro mortes ocorreram. Hambúrgueres bovinos preparados a 60°C ou menos foram identificados como veículo do surto (Davis *et al.*, 1993).

Ainda que carne moída subprocessada seja a fonte mais comum de infecção em humanos, leite cru, água e até mesmo bebidas ácidas, como por exemplo cidra e iogurte também têm sido incriminados (Morgan *et al.*, 1993; Ansay & Kaspar, 1997; Hudson *et al.*, 1997).

Surto associado com consumo de água também já foi relatado (Sivelä, 1995), resultando em quatro mortes, 32 hospitalizações e 243 casos de diarréia documentados. O patógeno foi isolado das fezes de pacientes e a doença acometeu somente os indivíduos que utilizaram água da rede pública. Deficiências no sistema de distribuição da água foram responsáveis pela contaminação (Rice, 1993).

O primeiro relato de infecção por *E. coli* O157:H7 associada ao consumo de leite cru ocorreu no ano de 1986, em Minnesota, resultando em síndrome urêmica hemolítica em dois indivíduos. A bactéria foi isolada dos pacientes, do leite cru e do gado leiteiro (Reitsma & Henning, 1996). Um surto similar ocorreu em Ontário, Canadá, envolvendo crianças que consumiram leite cru (Reitsma & Henning, 1996).

Um outro surto, devido ao consumo de leite pasteurizado foi documentado no Reino Unido em 1994, acometendo mais de 100 pessoas, sendo 46 com menos de 15 anos e 32 com 5 anos. Aproximadamente um terço foi hospitalizado.

Nove crianças entre 9 meses e 11 anos desenvolveram HUS, sendo que 6 delas necessitaram de diálise e uma pessoa idosa desenvolveu púrpura trombocitopênica trombótica. Cerca de 90% dos envolvidos haviam consumido leite pasteurizado engarrafado, proveniente de um laticínio local. *E. coli* O157:H7 foi isolada da tubulação e da engarrafadora do laticínio e mostrou-se idêntica aos isolados humanos (Upton & Coia, 1994). Este foi o maior surto de infecção por *E. coli* O157:H7 atribuído a leite e o primeiro relacionado com leite tratado termicamente (Sivelä, 1995).

No Egito, em 1994, três crianças morreram e outras seis tiveram diarreia severa em um surto de colite hemorrágica. A infecção foi epidemiologicamente atribuída a hambúrgueres, "koshari" e produtos lácteos (Abdul-Raouf *et al.*, 1996).

No Japão, houve um grande surto de infecção causada por *E. coli* O157:H7 que atingiu mais de oito mil pessoas, sendo a maioria crianças. Pelo menos 460 alunos da rede de ensino de primeiro grau tiveram que ser hospitalizados. Houve quatro mortes. Sushi de enguia, carne de porco, fígado e frango foram apontados como veículos da doença (Anônimo, 1996; Swinbanks, 1996). Brotos de rabanete cultivados hidroponicamente foram implicados em vários surtos naquele país, incluindo um grande episódio na cidade de Sakai, em 1996 e outro de extensão menor, nas cidades de Yokohama e Gamagori, em 1997 (Itoh *et al.*, 1998).

Os bovinos são considerados importante reservatório de *E. coli* O157:H7 (Doyle & Schoeni, 1987; Stavric & Speirs, 1989; Wells *et al.*, 1991; Meng *et al.*, 1994). Alguns autores afirmam que o gado leiteiro, especialmente os animais mais jovens são portadores deste microrganismo (Riley, 1987; Doyle, 1991; Armstrong *et al.*, 1996), sendo que geralmente a bactéria é excretada por períodos mais longos pelos bezerros do que por animais adultos (Armstrong *et al.*, 1996).

As técnicas de manejo do gado influenciam na proliferação de *E. coli* O157:H7 no rúmen. O trato gastrointestinal do gado bem alimentado não favorece o crescimento desta bactéria, quando comparado ao gado que sofreu privação

alimentar, possivelmente devido às altas concentrações de ácidos graxos voláteis e menor pH encontrados no rúmen do gado bem alimentado. Rasmussen *et al.* citados por Pell (1997) e por Harmon (1999) alertam para os seguintes fatos: a) para reduzir a probabilidade de contaminação pelo patógeno na planta de processamento de carne, os animais que são enviados ao abatedouro não devem estar em jejum e b) pesquisas conduzidas com gado bem alimentado podem não refletir a verdadeira prevalência de *E. coli* O157:H7.

Sob condições experimentais, bezerros inoculados com *E. coli* O157:H7 excretavam o patógeno nas fezes em quantidades variáveis, ou intermitentemente, sem mostrar sinais de doença (Harmon *et al.*, 1999). Além disso, os bezerros desmamados excretavam maiores níveis de *E. coli* O157:H7 do que os que ainda estavam sendo amamentados ou do que os animais adultos (Cray *et al.*, 1998).

Dados recentes mostram a prevalência de *E. coli* produtora de toxina Shiga *like* nas fezes do gado no abatedouro, comparativamente àquele nas pastagens da fazenda (Harmon *et al.*, 1999).

Com o intuito de confirmar a hipótese estabelecida por Diez-Gonzalez *et al.* (1998) de que o gado alimentado com grãos excreta um grande número de cepas de *E. coli* ácido-resistentes em suas fezes, enquanto que aquele alimentado com feno/capim/alfafa não excreta tais linhagens, Hovde e colaboradores (1999) desenvolveram um estudo para avaliar a duração da excreção de *E. coli* O157:H7. Assim, novilhas foram submetidas a 4 tipos de dietas: 62,1% de cevada-19,3% milho; 90% de milho; 100% alfafa de média qualidade e 100% de capim de baixa qualidade. Os resultados revelaram que o período médio de excreção de *E. coli* O157:H7 pelos animais alimentados com grãos foi de 4 dias, enquanto aqueles alimentados com alfafa ou capim excretaram a bactéria por 39 e 42 dias, respectivamente, e, independentemente da dieta, *E. coli* O157:H7 mostrou-se ácido-resistente. Segundo Hovde e colaboradores (1999), a alimentação do gado com muita fibra pode aumentar o risco de infecção humana por *E. coli* O157:H7.

Já Diez-Gonzalez *et al.* (1998) postularam que os patógenos presentes em animais submetidos a dietas ricas em fibras seriam mortos pelo choque ácido similar às condições do estômago humano, diminuindo o risco de doenças de origem alimentar. O ponto central de seu argumento é a extrapolação na qual *E. coli* O157:H7 seja semelhante às cepas genéricas não patogênicas de *E. coli* que eles analisaram.

Pesquisas realizadas em fazendas detectaram a presença de *E. coli* O157:H7 também nas fezes de veados, ovelhas, cães, cabras e de cavalo (Cray *et al.*, 1998).

Doyle & Schoeni (1987), analisando amostras de carne de boi moída, carne de porco, ave e carneiro das seções de refrigerados de diversas mercearias de Madison, USA, concluíram que 3,7, 1,5, 1,5 e 2,0%, respectivamente, estavam infectadas por *E. coli* O157:H7.

*E. coli* O157:H7 foi isolada em 6% das amostras de carne moída, 4% de amostras de frango desossado, 4% de carne de carneiro e 6% de leite de vaca não pasteurizado em Assuã- Egito (Abdul-Raouf *et al.*, 1996).

### **3.5. Métodos de Isolamento de *E. coli* O157:H7**

Vários métodos têm sido desenvolvidos para detecção e isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de amostras de alimentos e clínicas (Padhye & Doyle, 1992). A maioria dos procedimentos tradicionalmente utilizados para detectar coliformes fecais e posteriormente *E. coli* empregam temperaturas de incubação na faixa de 44-45°C. No entanto, *E. coli* O157:H7 tem crescimento restrito neste intervalo de temperatura (Doyle & Schoeni, 1984).

A incapacidade de fermentar sorbitol em 24 horas tem sido considerada uma característica fenotípica de *E. coli* O157:H7, e meios contendo sorbitol, tais como Ágar MacConkey-sorbitol são utilizados como meios diferenciais para esta bactéria em relação a outros organismos entéricos (Padhye & Doyle, 1992).

Contudo, mais de 5% dos isolados clínicos, incluindo *Escherichia hermanii* e algumas cepas de *E. coli* O157:H16 são sorbitol negativas (Wells *et al.*, 1991).

Com base nestas observações, Haldane *et al.* (1986) sugeriram a realização de testes para descarboxilação de lisina e de ornitina para suplementar o ensaio que emprega sorbitol.

Uma metodologia preconizada pelo Compendium of Standard Methods for Microbiological Examination of Foods - APHA (1992) recomenda a diluição 1:10 da amostra em solução de peptona a 0,1%, seguida de diluições seriadas adequadas e inoculação de 1mL de cada diluição, em duplicata, na superfície de Ágar MacConkey Sorbitol. As placas são incubadas a 35°C e lidas após 18 horas. As colônias que não fermentam sorbitol (típicas de *E. coli* O157:H7) apresentam-se transparentes ou de coloração pálida quando comparadas às fermentadoras (maioria das cepas de *E. coli*). A confirmação de colônias típicas se faz através de reação com antissoros O157 e H7. Este meio tem sido adotado para o isolamento do microrganismo em amostras clínicas e alimentos; no entanto, altos níveis de coliformes contaminantes podem interferir nos resultados (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Szabo *et al.* (1986) desenvolveram um meio de isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de alimentos, plaqueando diretamente homogeneizados de amostras (em solução peptonada 0,1%) em um meio contendo triptona, sorbitol, cloreto de sódio, sais biliares nº3, MUG e púrpura de bromocresol, denominado meio HC. A adição de cloreto de sódio permitiu aumentar o limite de temperatura utilizada para crescimento. Uma concentração de sais biliares menor do que a usualmente empregada nos meios para seleção de *E. coli*, porém ainda com ação inibitória sobre organismos não entéricos, foi utilizada. A detecção de *E. coli* O157:H7 baseou-se na incapacidade do patógeno em hidrolisar MUG e fermentar sorbitol em 24 horas, sendo as placas incubadas por 18 horas a 44,5°C. Nestas condições, as colônias típicas adquiriram tonalidade azul, não fluorescendo sob luz ultravioleta. Este procedimento permitiu recuperar de  $10^3$  a  $10^4$  células/g, mas

não atuou muito bem no isolamento do microrganismo em alimentos naturalmente contaminados (Szabo *et al.*, 1986; Meng *et al.*, 1994).

Vários meios de cultura para plaqueamento direto têm-se mostrado adequados para a seleção de *E. coli* O157:H7, porém o ágar MacConkey sorbitol suplementado com MUG (MSMA) é o mais recomendado (Clavero & Beuchat, 1995). Contudo, Abdul-Raouf *et al.* (1993) citados por Clavero & Beuchat (1995) relataram que o ágar MSMA falhou na detecção de células de *E. coli* O157:H7 estressadas pelo calor em amostras de rosbife. Conner & Hal (1994), citados por Clavero & Beuchat (1995), reportaram que MSMA foi inadequado para a recuperação de células deste patógeno a partir de aves congeladas. Estas observações têm aumentado a suspeita da inadequação do meio MSMA para contagem de rotina de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

A semeadura direta em superfície dos meios ágar eosina azul de metileno de Levine modificado sem lactose (MEMB) e ágar SD-39 modificado (MSD) apresentou resultados satisfatórios quando foi utilizada para a recuperação de células de *E. coli* O157:H7 presentes em hambúrguer. Na composição destes dois meios de cultura não havia sais biliares, sendo a inibição de bactérias não entéricas feita através da adição de novobiocina. As colônias típicas de *E. coli* O157:H7 no MEMB adquiriam coloração vinho e as que não eram O157 ficavam róseas. O microrganismo no MSD tinha cor rósea e não fluorescia sob luz ultravioleta, enquanto as cepas não-O157 ficavam amarelas (Clavero & Beuchat, 1995).

Abdul-Raouf *et al.* (1996) tentaram realizar contagem de *E. coli* O157:H7 a partir de amostras de carne bovina, de ovelha, de aves e de leite cru em Assuã - Egito. Todas as amostras foram coletadas em um período de 3 meses e armazenadas a -5°C até serem analisadas. Após o descongelamento, cada amostra foi dividida em 2 subamostras. Porções de 25g, em duplicata, foram combinadas com 225 mL de caldo triptona soja modificado (mTSB) e homogeneizadas em um homogeneizador de pistões ("stomacher") por 2 minutos.

Os homogeneizados foram diluídos em série em solução peptonada a 0,1%. Homogeneizados diluídos e não diluídos foram inoculados em superfície de ágar MacConkey sorbitol-MUG (MSMA). As placas foram incubadas por 16-18h a 37°C antes das colônias presuntivas serem contadas. A segunda subamostra também foi dividida em porções de 25g e cada porção combinada com 225 mL de mTSB, incubada sob agitação (150 rpm) por 24 h a 37°C. As culturas enriquecidas foram diluídas em série em água peptonada 0,1%, plaqueadas em superfície de MSMA e incubadas a 37°C por 16-18h. As colônias suspeitas foram identificadas através de testes bioquímicos em kit API 20E e sorológicos, por aglutinação em látex. *E. coli* O157:H7 foi isolada a partir de 3 amostras (6%) de carne bovina moída, 2 (4%) de amostras de aves, 1 (4%) de carne de ovelha e 3 (6%) de leite cru. Apesar de colônias sorbitol negativas terem sido detectadas em ágar MSMA através do plaqueamento direto, nenhuma destas colônias foi identificada como *E. coli* O157:H7. O enriquecimento foi necessário para a detecção deste patógeno nas amostras. As populações em mTSB após enriquecimento a 37°C por 16-18 h variaram entre 3,16 a 6,03 log UFC/mL.

Um método desenvolvido e utilizado com êxito para isolar pequenas populações (até 1,5 UFC/g) deste microrganismo a partir de alimentos como carne bovina, aves cruas e leite é um ensaio imunológico baseado na detecção de células produtoras de verotoxinas VT1 e VT2. É feito um enriquecimento por 18-24 h a 37°C sob agitação (100 rpm) em meio seletivo (TSB+novobiocina). Após incubação, dilui-se a cultura enriquecida em solução de tampão fosfato e 1 mL de cada diluição é filtrado através de um filtro de membrana hidrofóbica incubando-se cada filtro sobre papel de nitrocelulose (com porosidade 0,45µm) colocado sobre a superfície de um ágar seletivo (TSA+novobiocina) a 37°C por 24h (Doyle & Schoeni, 1987; Meng *et al.*, 1994). O imunoensaio é realizado empregando-se antissoro VT1 e VT2, selecionando-se, a partir da membrana hidrofóbica, as colônias que correspondem a sítios positivos (áreas azuis) e confirmando-se os isolados através de testes bioquímicos, sorológicos e de produção de verotoxina.

Este procedimento não é utilizado na rotina devido a sua grande complexidade e alto custo (Padhye & Doyle, 1992; Meng *et al.*, 1994).

Uma outra metodologia que emprega membrana hidrofóbica e um anticorpo monoclonal específico para *E. coli* O157:H7 é capaz de detectar uma quantidade pequena de células deste patógeno, como por exemplo 10 UFC/g de alimento. A amostra de alimento é misturada com solução peptonada, macerada em "stomacher", filtrada para remoção de partículas de alimento e, a seguir, filtrada através de membrana hidrofóbica. As membranas são colocadas na superfície de ágar HC segundo Szabo *et al.* (1986) e incubadas a 43°C por 10-20 horas. As colônias retidas na membrana são submetidas a um imunoensaio, sendo necessário confirmá-las através de testes bioquímicos e sorológicos, porque o anticorpo monoclonal reage com todas as cepas de *E. coli* O157 (incluindo cepas diferentes de H7) e outras bactérias como as do grupo *Salmonellae* N (Padhye & Doyle, 1992; Meng *et al.*, 1994).

Um outro procedimento de rastreamento para isolar *E. coli* O157:H7 de carne moída envolve várias etapas. A carne moída é adicionada a caldo EC modificado (caldo EC com 1,2 g de sais biliares nº3 por litro e 20 mg de novobiocina por litro) e incubada a 37°C/6 h, com agitação de 100 rpm ou a 35°C por 24h sob condições estáticas. Após incubação, a cultura enriquecida é diluída apropriadamente, espalhada sobre Ágar MacConkey Sorbitol e as placas incubadas a 42°C por uma noite. As colônias sorbitol negativas são estriadas em ágar eosina azul de metileno e em ágar sorbitol vermelho de fenol com MUG. Os isolados que forem sorbitol negativo e MUG negativo e apresentarem comportamento típico de *E. coli* em ágar eosina azul de metileno (*E. coli* adquire coloração negra com ou sem brilho verde metálico) são confirmados bioquímica e sorologicamente. A sensibilidade deste método é de 5 células de O157:H7 por grama (Okrend *et al.*, 1990 a; Vanderzant & Splittstoesser, 1992; Padhye & Doyle, 1992).

Okrend *et al.* (1990 c) sugeriram a adição de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucurônico (BCIG) ao meio MacConkey Sorbitol para isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de carne moída, com base na diferenciação de colônias  $\beta$ -glucuronidase positivas das negativas. A adição deste ácido causou uma diminuição no número de colônias falso-positivas presentes no meio seletivo sem este componente (Padhye & Doyle, 1992).

Outro procedimento descrito por Okrend *et al.* (1990 b) utiliza um ensaio de ELISA que detecta antígeno *E. coli* O157:H7. O método envolve a inoculação da carne em Caldo EC modificado, incubação, sob agitação, por 6-8 h a 37°C e inoculação de diluições da cultura enriquecida em placas de Petrifilm 3M para contagem de *E. coli*. A seguir, as placas são incubadas a 42°C por 18 horas, sendo as colônias replicadas em discos reativos e testadas para a presença de antígeno O157, através de um imunensaio usando antissoro ativado contra *E. coli* O157. As colônias com resultados positivos são isoladas diretamente do Petrifilm e estriadas em MacConkey sorbitol e MacConkey sorbitol com BCIG. Este método é rápido, permitindo identificação presuntiva do microrganismo em 26-28 horas, com sensibilidade de 0,6 *E. coli* O157:H7 por grama de alimento, com 0% de falso-negativos e 2% de falso-positivos. Uma vez que o procedimento emprega antissoro policlonal, todas as amostras positivas devem ser confirmadas através do isolamento do organismo, dispendendo 3 a 4 dias para sua realização (Padhye & Doyle, 1992; Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Segundo Weagant *et al.* (1995), as técnicas de separação imunomagnética resultam em grande sensibilidade, especificidade e rapidez na identificação de microrganismos. Este método tem sido utilizado em conjunto com ágar MacConkey sorbitol desenvolvido por March e Ratnam (1989) e uma modificação deste meio contendo cefixima e telurito de potássio, o qual é mais seletivo e facilita o reconhecimento de colônias *E. coli* O157 (Zadik *et al.*, 1993). Bolton *et al.* (1995) descreveram um procedimento usando caldo triptona soja modificado incubado a 42°C, com subsequente separação imunomagnética e cultura em ágar

MSCT, o qual recuperou, com sucesso, *E. coli* O157 a partir de amostras de hambúrgueres e carne picada naturalmente contaminadas e inoculadas experimentalmente. Em 1996, Bolton *et al.* demonstraram que a combinação de enriquecimento em caldo triptona modificado incubado a 42°C por 6 horas, seguido de separação imunomagnética e subcultura em ágar MSCT foi o método mais sensível e seletivo para o isolamento deste patógeno a partir de carne e derivados crus (Bolton *et al.*, 1996; Vernozy-Rozand *et al.*, 1997).

Cohen & Kerdahi (1996) avaliaram o sistema VITEK Imunodiagnóstico (VIDAS<sup>®</sup>) para uso na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente (2 a 4 UFC/25g e com 7 a 10 UFC/25g) em 65 amostras de queijos macios e duros. O patógeno foi detectado através do VIDAS<sup>®</sup> em todas as amostras que continham inóculo alto, enquanto que em 5 queijos (7,7%) inoculados com baixa quantidade de células, a bactéria não foi detectada. Não houve falsos-positivos e a composição dos queijos não causou interferência no método. Este método apresenta as vantagens de triagem rápida, boa sensibilidade (detecta baixos níveis de células), mas limita-se à detecção de apenas um sorogrupo. Apesar de linhagens de *E. coli* enterohemorrágica produtora de toxina pertencerem ao sorogrupo O157:H7, outros sorogrupos, incluindo tanto cepas importantes como irrelevantes clinicamente também produzem STs. Já ocorreram surtos por patógenos não O157 veiculados por alimentos, como exemplos: sorogrupo O104:H21 foi responsável por surto em Helena, USA e uma cepa fermentadora de sorbitol do sorogrupo O111:NM (não móvel) foi relatada em surto na Austrália. Estas cepas foram detectadas por PCR usando “primers” para os genes das toxinas ST1 e ST2. Elas provavelmente deixaram de ser detectadas pelos métodos baseados em anticorpos, os quais detectam antígenos da superfície celular somente do sorogrupo O157:H7.

Vernozy-Rozand *et al.* (1997), na França, avaliaram os métodos de separação imunomagnética (SIM) e VIDAS<sup>®</sup> na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente (8 UFC/g e 20 UFC/g) em 5 amostras de carne

picada e em 5 amostras de queijo fabricado a partir de leite cru. O método de SIM consistiu na homogeneização de 25 g da amostra com 225 mL de mTSB + novobiocina para amostras de carne ou 225 mL de mTSB com acriflavina para amostras de queijo, seguida de incubação a 42°C por 6 h. Esferas recobertas com anticorpos para *E. coli* O157 (Dynabeads anti-*E. coli* O157: Dynal, Dynalbeads, Dynal France) foram utilizadas na imunocaptura. O procedimento de SIM foi realizado de acordo com instruções do fabricante empregando-se 1 mL da cultura enriquecida adicionada a 20µL de Dynabeads. Um volume de 50µL de Dynabeads ressuspensos foi utilizado para inocular o ágar MSCT. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24h, seguido de confirmação de colônias fermentadoras e não fermentadoras de sorbitol. A preparação das amostras submetidas à técnica VIDAS® foi feita de acordo com o procedimento anterior, exceto que 1 mL do caldo enriquecido foi adicionado a 1 tubo contendo 9 mL de caldo MacConkey cefixima telurito (MSCT), seguido de incubação a 37°C/18-24h e testando-se para a presença de *E. coli* O157:H7 segundo protocolo do fabricante. Os dois métodos foram capazes de detectar o patógeno em carne inoculada com 8 e 20 UFC/g. No entanto, apenas 3 queijos apresentaram-se positivos quando analisados por SIM quando o inóculo era menor (8 UFC/g). A detecção da bactéria em menor quantidade de amostras de queijo através de SIM comparativamente ao VIDAS pode ter sido causada pela interferência da gordura. Posteriormente a este ensaio, 250 amostras de alimentos, tais como queijo a partir de leite cru, aves, lingüiças cruas e carne moída do comércio varejista francês foram analisadas empregando-se os 2 métodos; no entanto, o patógeno não foi detectado em nenhuma delas. Contudo, 6 amostras de alimentos forneceram resultados preliminares positivos com o uso do VIDAS® e também através de SIM. Mais precisamente, 5 destas amostras (4 de frango e 1 de lingüiça crua) continham *E. coli* móvel, sorbitol positiva, O157 positiva, H7 negativa e não produtora de verotoxina. Em 1 amostra de carne moída foi encontrada *E. coli* móvel, sorbitol negativa, O157 positiva, H7 negativa e não produtora de verotoxina. Como há uma crescente evidência sugerindo que variações fenotípicas existem entre os isolados de *E. coli* O157:H7,

colônias sorbitol negativas e positivas (presentes no ágar MSCT após SIM) também foram testadas para antígeno O157 por aglutinação em látex quando o VIDAS<sup>®</sup> forneceu resultados positivos. Este estudo demonstrou que um método de ELISA direcionado para o antígeno O157 tem uma maior chance de detectar *E. coli* O157 sorbitol positiva em amostras de alimentos comparativamente aos métodos culturais, uma vez que a triagem feita pelos laboratórios busca principalmente o fenótipo sorbitol negativo no isolamento de *E. coli* O157:H7 (Vernozy-Rozandi *et al.*, 1997).

Uma desvantagem do método de ELISA são os resultados positivos fornecidos por bactérias que exibem o antígeno O157, como *Citrobacter freundii*, *Salmonella* grupo N, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolytica* sorogrupo O:9, *Pseudomonas maltophilia* 555 e *E. coli* O157 não patogênica. Estes resultados falso-positivos podem ser suprimidos pelo uso de meios de enriquecimento contendo cefixima e telurito, porque a concentração inibitória mínima mostrou-se ser maior para *E. coli* O157:H7 do que para outras *E. coli* e para muitos microrganismos entéricos não fermentadores de sorbitol, tais como *Aeromonas* ssp, *Plesiomonas* ssp, *Morganella morganii*, *Providencia* spp e *Hafnia alvei* (Vernozy-Rozand *et al.*, 1997).

Blanco *et al.* (1996) sugerem, para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, a seguinte metodologia: 25 g do alimento são adicionados a 225 mL de água tamponada peptonada (BPW) suplementado com 8 mg/L de vancomicina, 0,05 mg/L de cefixima e 10 mg/L de cefsulodina. Estes antibióticos têm a função de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e de *Aeromonas* e *Proteus*, respectivamente. As amostras são homogeneizadas e incubadas a 37°C/6h. Após enriquecimento, segue-se a separação imunomagnética com Dynabeads anti *E. coli* O157 (Oxoid) e depois semeadura em ágar MSCT, incubando-se por 18 h a 37°C. As colônias não fermentadoras de sorbitol são submetidas a sorologia e a testes de produção de verotoxinas por PCR. Recomenda-se a identificação completa de *E. coli*, uma vez que já foram descritas reações imunológicas

cruzadas entre o antígeno O157 e o de *E. coli* e certas cepas de *Escherichia hermannii*, *Brucella*, *Citrobacter freundii* e *Salmonella*.

Em estudo realizado por Stephens & Joynson (1998), os caldos mTSB e BPW foram suplementados com 20 mg/L de novobiocina; 10 mg/L de acriflavina; uma mistura de vancomicina (8 mg/L), cefsulodina (10 mg/L) e cefixima (0,05 mg/L) ou uma mistura de vancomicina (8 mg/L), cefsulodina (2,5 mg/L) e cefixima (0,0125 mg/L). A adição de sais biliares e fosfato ao caldo TSB para produzir mTSB tornou o meio inibitório para a recuperação e crescimento de *E. coli* O157:H7 submetida a estresse ácido e por sal a 37°C. Já a adição de novobiocina ou acriflavina ao caldo mTSB causou não teve efeito tóxico sobre as células injuriadas. Vancomicina, cefsulodina e cefixima aumentaram a toxicidade do meio mTSB. A suplementação do BPW com os antibióticos novobiocina e acriflavina não pareceu afetar significativamente a recuperação de *E. coli* O157:H7 estressadas por ácido ou sal, enquanto que a suplementação com vancomicina, cefsulodina e cefixima do BPW causou inibição em mais de 1 ciclo logarítmico nas células recuperadas quando comparados com BPW não suplementado. A redução das concentrações de cefsulodina e cefixima para um quarto diminuiu o poder inibitório do meio, porém ainda 0,5 ciclo log de células deixaram de ser recuperadas comparativamente ao BPW não suplementado. A suplementação do BPW com os 3 antibióticos (cefixima, cefsulodina e vancomicina) aliada à temperatura de incubação de 42°C aumentou ainda mais a toxicidade deste meio. O caldo contendo cefixima e cefsulodina em menor concentração pareceu não ter efeito inibitório a temperaturas de 37° e de 42°C. Não houve nenhum efeito significativo causado pelas adições de sais biliares, novobiocina e acriflavina ao TSB na recuperação e crescimento a 37°C de *E. coli* O157:H7 não injuriada. A adição de vancomicina, cefsulodina e cefixima ao BPW, no entanto, provocou uma queda na recuperação e crescimento de 0,4 ciclos log das células não estressadas comparativamente ao caldo controle não suplementado.

Em pesquisa realizada por Flint & Hartley (1995), *E. coli* O157:H7 foi isolada a partir de uma variedade de produtos lácteos (leite em pó desnatado, integral e infantil, queijos Cheddar e Gouda, caseína láctea e caseinato de sódio, concentrados protéicos de soro) através de 2 métodos empregados paralelamente: enriquecimento e semeadura seletivos de acordo com o FDA e TECRA® *E. coli* visual. Amostras, em duplicata, de 25 g de alimento foram homogeneizadas com os caldos de enriquecimento, a saber: caldo triptona novobiocina (TNB) segundo FDA e caldo triptona soja modificado com acriflavina-HCl (mTSB+A) para o TECRA®. As amostras receberam inóculos de 0,4, 4 e 40 UFC/g de *E. coli* O157:H7. O patógeno foi detectado em todas as amostras e em todos os níveis de inóculo tanto pelo TECRA® como pelo FDA, não havendo resultados falsos-negativos ou falsos-positivos.

Enquanto métodos convencionais para detecção de *E. coli* O157:H7 envolvem isolamento e confirmação do isolado através de testes bioquímicos e sorológicos, técnicas modernas tais como hibridização de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR) também vêm sendo aplicadas (Meng *et al.*, 1994).

### **3.6. Condições Higiênico-Sanitárias do Leite Cru e do Queijo Tipo Minas-Frescal**

O leite cru, destinado à produção de queijo tipo Minas-frescal geralmente não apresenta qualidade higiênico sanitária satisfatória, podendo ser veículo de contaminação por patógenos caso não seja adequadamente pasteurizado e manipulado (Pereira *et al.*, 1991; Carmo *et al.*, 1999).

O queijo Minas, produto amplamente consumido no Brasil, é geralmente fabricado com leite cru, não recebendo tratamento algum para redução da carga microbiana (Sabioni *et al.*, 1988; Assis *et al.*, 1991; Carmo *et al.*, 1999), apesar da legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado para o preparo do mesmo (Pereira *et al.*, 1991, Portaria nº 352/97 – MA/DIPOA; Carmo *et al.*, 1999).

Esta condição se agrava com a falta de higiene durante a elaboração do queijo, transporte e armazenamento inadequados (Garcia-Cruz *et al.*, 1994).

Em estudo realizado por Fonseca (1995) com queijo Minas produzido artesanalmente, revelou-se que a totalidade das amostras continha fosfatase, comprovando a utilização de leite cru como matéria-prima. O aumento da produção leiteira, durante o período de safra é acompanhado da queda de preço do leite e do queijo. O setor, diante deste quadro, utiliza como alternativa para reduzir os custos de produção a política de cotas, pagando menos pela matéria-prima excedente. Esta conduta reduz a renda do produtor, o qual passa a utilizar alternativas diversas para contornar o problema e suprir suas necessidades econômicas. Assim, o leite excedente é destinado à fabricação artesanal de produtos lácteos, principalmente de queijo Minas frescal. Diante dessa situação, formou-se um contingente populacional significativo envolvido com a produção de queijo Minas que, contudo, não consegue se inserir no mercado formal de trabalho. Há, portanto, um mercado marginal de produtos lácteos sem inspeção sanitária, com sérios riscos para os consumidores e que exige ações específicas dos serviços de vigilância sanitária.

Para queijo Minas frescal, a Portaria 451 - DINAL/MS de 1997 estabelece um limite máximo permitido de coliformes fecais de  $10^2$  NMP (Número Mais Provável) por grama.

Em trabalho referente à qualidade microbiológica de queijo Minas-frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Silva (1980) constatou que 78,33% das amostras de queijo Minas apresentaram contagens de *E. coli* superiores a  $10^2$ /g. Nesta mesma cidade, Raimundo *et al.* (1992) observaram contagens superiores a  $10^3$  coliformes fecais/g em 39% das amostras.

Entre outubro de 82 e setembro de 83, foram examinadas 51 amostras de queijos tipo Minas frescal de fabricação artesanal, sem marcas, procedentes de fazendas próximas ou não à cidade de Ouro Preto - MG. Em relação às contagens

de bactérias psicrófilas e mesófilas não lácticas, 52,94% e 80,39% das amostras estavam entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/g e  $10^5$  e  $10^8$  UFC/g, respectivamente; para *S. aureus*, 62,75% apresentaram contagens entre  $10^5$  e  $10^7$  UFC/g; para coliformes, 62,75% com contagens variando entre  $10^5$  a  $10^8$ /g (NMP) e para coliformes de origem fecal, 62,75% apresentaram populações entre  $10^3$  e  $10^6$ /g (NMP). Nas contagens de bolores e leveduras, 64,70% estavam entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/g (Nascimento *et al.*, 1985).

Em Lavras - MG, de um total de 144 amostras de queijo Minas-frescal obtidas no comércio, 63,9% tiveram contagens acima de  $10^2$  coliformes fecais/g (Gómez *et al.*, 1983).

Marinuzzi *et al.* (1990), em pesquisa feita na região de Viçosa - MG constataram que 95% das amostras de queijo Minas apresentavam mais que  $2,4 \times 10^3$  coliformes fecais/g e que 47,5% estavam contaminadas com *E. coli* enteropatogênica.

Garcia-Cruz *et al.* (1994) analisaram 11 amostras de queijo Minas na cidade de São José do Rio Preto, sendo 7 de fabricação artesanal, comercializadas em bares, mercados, açougues e supermercados de pequeno e médio portes, 3 industrializadas de marcas diferentes (1 microtexturizada) e uma produzida em laboratório sob estritas condições higiênicas. As amostras artesanais apresentaram contagens de bactérias aeróbias mesófilas entre  $1,31 \times 10^2$  e  $4,64 \times 10^6$  UFC/g, bolores e leveduras entre  $7,50 \times 10^1$  e  $2,20 \times 10^7$  UFC/g, *S. aureus* de  $2,60 \times 10^1$  a  $1,87 \times 10^8$  UFC/g; coliformes totais e fecais  $> 1100$ , sendo todas positivas para *E. coli* e 5 positivas para *Salmonella* sp. As amostras industrializadas continham coliformes fecais entre 43 e 460 e somente a amostra microtexturizada não foi positiva para *Salmonella*.

Pereira *et al.*, entre 1996 e 1997, analisando 20 amostras de queijo tipo Minas frescal em Belo Horizonte - MG com e sem SIF, não evidenciaram presença de *Salmonella* sp nestas amostras, contudo constataram que 90% das amostras

apresentavam contagens de coliformes fecais não toleradas por lei. Não foi verificada diferença significativa de qualidade entre amostras de queijo tipo Minas frescal com e sem SIF.

Araújo *et al.* (1997) analisaram 29 amostras de queijo Minas frescal de 3 marcas diferentes obtidas em padarias e supermercados da cidade do Rio de Janeiro e 100% das amostras apresentaram coliformes fecais com confirmação para *E. coli* em índices acima do estabelecido pelo Ministério da Saúde ( $10^2$  UFC/g), 62% apresentaram contagens acima de  $10^3$  UFC/g; *Aeromonas spp* foi isolada em 27,5%.

Foram analisadas 31 amostras de queijo Minas comercializadas sem marca ou qualidade específica no mercado de Viçosa - MG, sendo que 60,6% das amostras apresentaram índice de coliformes fecais acima do permitido pela portaria 01/87 - MS. A presença de *E. coli* foi constatada em todas as amostras (Pinto *et al.*, 1997).

Em pesquisa realizada em Belém do Pará - PA, Sousa *et al.* (1999) detectaram que, de 16 amostras de queijo Minas frescal analisadas, 68,75% apresentaram contagens de coliformes fecais em desacordo com os padrões legais vigentes.

Cunha *et al.* (1999) analisaram 32 amostras de queijo tipo Minas frescal coletadas no Estado do Rio de Janeiro entre outubro de 1998 e março de 1999 com e sem SIF. Estas foram analisadas quanto à presença e enumeração de *E. coli* e coliformes fecais; 50% das amostras apresentaram um grau de contaminação por coliformes fecais acima do tolerado por lei ( $>10^3$ ). Dessas, 75% tinham SIF e entre as restantes (50% dentro da faixa de tolerância), 81,75% tinham SIF. *E. coli* foi isolada de 87,5% (14/16) e 81,25% (13/16) das amostras com coliformes fecais  $> 10^3$  e  $< 10^3$  UFC/g, respectivamente. Os autores concluíram que mesmo com SIF, 50% dos queijos sob estudo estavam impróprios para consumo humano.

Sá Barreto & Pereira (1999) submeteram 22 amostras de diferentes marcas de queijo Minas frescal consumidas no município do Rio de Janeiro a análises de bolores e leveduras, coliformes totais e fecais, *Salmonella* e *S. aureus*. Verificaram que 19 (86,36%) mostraram-se em desacordo com a legislação vigente, apresentando contaminação por coliformes fecais (100%) e destas, 6 apresentaram contaminação concomitante por *S. aureus* (31,57%). Apenas 3 amostras apresentaram-se dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação.

Em estudo realizado por Pereira e colaboradores (1999), a presença de *E. coli* foi detectada em todas as 128 amostras de queijo tipo Minas (7 de frescal, 42 de canastra e 79 de padronizado) após 16 meses de armazenamento a -20° C.

Estes resultados, obtidos pela análise de amostras processadas em diferentes regiões do Brasil, confirmaram a predominância de condições higiênico-sanitárias deficientes no processo produtivo deste tipo de queijo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Amostras

- leite cru adquirido de um sítio na cidade de Sumaré - SP
- queijo tipo Minas-frescal adquirido no comércio da cidade de Campinas - SP

Foram analisadas 30 amostras de queijo tipo Minas frescal (cinco unidades de 6 marcas diferentes) com registro no Ministério da Agricultura e coletadas no comércio varejista da cidade de Campinas, SP e 30 amostras de queijo Minas frescal (5 unidades de 6 pontos distintos e de produtores diferentes) comercializadas informalmente na região de Campinas, SP e sem registro no Ministério da Agricultura. A coleta dessas 60 amostras foi realizada ao acaso.

As amostras foram assim codificadas:

- **A, B, C, D, E e F** para as com registro no Ministério da Agricultura, cujas datas de fabricação e de validade encontram-se na **Tabela 2**.
- **G, H, I, J, K e L** para as sem registro no Ministério da Agricultura. A amostra G foi coletada em mercearia de Campinas, e as demais amostras informais foram coletadas em chácaras e sítios da região de Campinas.

Durante a coleta e transporte, as amostras foram mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo analisadas no mesmo dia da coleta.

**TABELA 2.** Datas de fabricação e de validade das amostras de queijo Minas frescal registradas no Ministério da Agricultura

CÓDIGO DA AMOSTRA	DATA FABRICAÇÃO	DATA DE VALIDADE
A	05/06/99	05/07/99
B	12/06/99	02/07/99
C	23/06/99	23/07/99
D	26/06/99	24/07/99
E	30/06/99	30/07/99
F	08/07/99	07/08/99

#### 4.1.2. Meios de Cultura

- Caldo triptona e soja (TSB) - Difco
- Ágar triptona e soja (TSA) - Difco
- Ágar MacConkey sorbitol - Difco modificado (MSMA) segundo March & Ratnam (1986)
- Ágar HC segundo Szabo *et al.* (1986)
- Ágar eosina azul de metileno de Levine (EMB) - Difco
- Ágar eosina azul de metileno de Levine modificado sem lactose (MEMB) segundo Clavero & Beuchat (1995)
- Ágar SD-39 modificado (MSDA) segundo Clavero & Beuchat (1995)
- Ágar Rainbow O157 - Biolog com 20 mg/L de novobiocina (Rainbow+novobiocina)
- Ágar sorbitol vermelho de fenol + MUG (PRS+MUG), segundo Okrend *et al.* (1990 b)

- Caldo EC modificado com novobiocina (mEC+n), segundo Okrend & Rose (1989) citados por Johnson *et al.* (1995)
- Água tamponada peptonada com vancomicina, cefixima e cefsulodina (BPW + 3 antibióticos), segundo Blanco *et al.* (1996)
- Ágar MacConkey sorbitol - Difco com cefixima e telurito de potássio (MSCT) segundo Blanco *et al.* (1996)
- Solução-tampão fosfato de Butterfield
- Solução-tampão citrato a 2%
- Caldo triptona e soja modificado com casaminoácidos e 10 mg/L de acriflavina (mTSB), segundo Padhye & Doyle (1991)
- Ágar HC segundo Szabo *et al.* (1986) suplementado com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio (HCCT)
- Ágar eosina azul de metileno de Levine modificado sem lactose segundo Clavero & Beuchat (1995) suplementado com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio (MEMBCT)
- Ágar SD-39 modificado segundo Clavero & Beuchat (1995) suplementado com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio (MSDACT)
- Ágar Rainbow O157 - Biolog com 20 mg/L de novobiocina suplementado com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio (Rainbow+nCT))
- Caldo triptona e soja tamponado + 20mg/L de novobiocina - BTSB+n (segundo TECRA® - Austrália)
- Caldo triptona e soja modificado suplementado com 20mg/L de novobiocina, 0,05mg/L de cefixima, 10mg/L de cefsulodina e 8mg/L de vancomicina (Caldo de enriquecimento para EHEC- EEB) , segundo FDA, 1998.

#### 4.1.3. Reagentes

- 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucuronídeo (MUG) - Sigma
- novobiocina sódica - Sigma
- cefixima - Merck
- telurito de potássio - Merck
- vancomicina - Lilly
- casaminoácidos - Difco
- acriflavina-hidrocloreto - Sigma
- cefsulodina - Sigma
- monensina - Sigma

#### 4.1.4. Outros

- Cepa de *Escherichia coli* O157:H7, obtida do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro e caracterizada previamente quanto a sua pureza e identidade por testes de polimerase em cadeia - PCR, sorologia e provas bioquímicas convencionais
- Sistema de identificação BBL CRYSTAL Rapid Stool/Enteric ID KIT
- Imunoensaio visual (VIA) para *E. coli* O157 - TECRA<sup>®</sup> - Bioenterprises Pty Ltd, Roseville, NSW - Austrália

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Teste de resistência de *E. coli* O157:H7 à novobiocina

*E. coli* O157:H7 foi semeada em tubo contendo ágar TSA inclinado e incubada a 35°C por 24 horas. A seguir, transferiu-se uma alçada da cultura para 10 mL de caldo TSB e incubou-se a 35°C por 24 horas. Após esse período, transferiu-se uma alçada do caldo para outro tubo com 10 mL do mesmo meio e incubou-se a 35°C por 24 horas.

Foram feitas diluições seriadas (1:10) do inóculo até  $10^{-7}$ , em tampão fosfato de Butterfield.

Adicionou-se 0,1 mL, em duplicata, desse inóculo a tubos de 10 mL de caldo TSB contendo diferentes concentrações de novobiocina de sódio, conforme **Tabela 3**. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 h e o crescimento avaliado pela evidência de turbidez.

**Tabela 3.** Caldo TSB com diferentes concentrações de novobiocina

TUBO	Concentração de novobiocina (mg/L)
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50
6	60
7	70
8	80
9	90
10	100

#### 4.2.2. Comportamento de *E. coli* O157:H7 e da microbiota de queijo Minas-frescal sob ação de antibióticos

O inóculo de *E. coli* O157:H7 foi preparado conforme descrito em 4.2.1 e transferindo-se uma alçada do mesmo para tubos de caldo TSB contendo diferentes concentrações de antibióticos, conforme **Tabela 4**.

Uma alíquota de 25 g de queijo Minas frescal foi homogeneizada por 2 minutos em homogeneizador de pistões (“stomacher”) com 225 mL de tampão citrato a 2%, seguido de transferência de uma alçada desta diluição ( $10^{-1}$ ) para tubos contendo 10 mL de TSB com diferentes concentrações de antibióticos, de forma idêntica à descrita para a cultura de referência.

A seguir, os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas, com posterior avaliação visual do crescimento.

**Tabela 4.** Caldo TSB suplementado com diferentes concentrações de vancomicina, cefsulodina e cefixima

TUBO	Concentração de vancomicina (mg/L)	Concentração de cefsulodina (mg/L)	Concentração de cefixima (mg/L)
1	8	10	0,05
2	12	15	0,075
3	16	20	0,10
4	24	30	0,15
5	32	40	0,20
6	40	50	0,25
7	48	60	0,30
8	56	70	0,35
9	64	80	0,40
10	72	90	0,45
11	80	100	0,50
12	120	150	0,75

#### 4.2.3. Avaliação de técnicas de contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru e de queijo Minas frescal

O estudo foi desenvolvido visando avaliar o comportamento de cinco meios sólidos e seletivos de cultura (HC, MSDA, MEMB, MSMA e Rainbow+novobiocina) em relação ao seu desempenho na contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo tipo Minas-frescal e de leite cru, sem redução da microbiota contaminante original.

O inóculo foi preparado de forma idêntica à descrita em 4.2.1. Em continuação, foram feitas diluições decimais sucessivas do mesmo em solução tampão citrato a 2%, de forma a assegurar que as amostras inoculadas recebessem uma população de  $10^2$  UFC/g ou mL. A monitorização do inóculo foi feita através de contagens em placas contendo TSA, incubadas a 35°C durante 24 horas.

Na execução dos ensaios, porções de 25 g e 25 mL das amostras de queijo e leite, respectivamente, foram inoculadas com 2 mL da suspensão de *E. coli* O157:H7, homogeneizadas em homogeneizador de pistões por 2 minutos e deixadas em repouso a 4°C por 2 horas.

A seguir, as amostras de queijo foram diluídas em 225 mL de tampão citrato 2% e novamente homogeneizadas em homogeneizador de pistões por 2 minutos, resultando na diluição  $10^{-1}$ . Diluições decimais foram preparadas até  $10^{-2}$  e alíquotas de 1,0 mL (0,3, 0,3, 0,3 e 0,1) e 0,1 mL da diluição  $10^{-1}$  e 0,1 mL da diluição  $10^{-2}$ , em duplicata, foram espalhadas superficialmente nos meios MSMA, MEMB, MSDA, HC e Rainbow+novobiocina.

Um mL (0,3, 0,3, 0,3 e 0,1) e 0,1 mL da amostra integral de leite e 0,1 mL, em duplicata, da amostra diluída 1:10 em tampão citrato 2% foram espalhados na superfície dos mesmos meios descritos anteriormente, que foram posteriormente incubados a 35°C por 24-48 horas.

As placas de MSMA, MSDA e HC foram observadas sob luz ultravioleta, enquanto que as de MEMB e Rainbow, sob observação direta.

Selecionaram-se 5 colônias típicas de cada meio de cultura, as quais foram submetidas a testes preliminares de identificação em meios de ágar PRS-MUG (por estrias) e EMB-Levine (por picada), com as placas sendo incubadas a 35°C por 24 horas e observadas quanto às características típicas: colônias de cor rósea e sem desenvolvimento de cor azul sob luz UV no PRS-MUG e de coloração escura com brilho verde metálico em EMB. Em continuação, as colônias suspeitas foram confirmadas bioquimicamente por inoculação em kit Crystal -BBL.

Foram efetuadas três repetições desse ensaio.

#### **4.2.4. Avaliação do efeito da suplementação de meios seletivos com cefixima e telurito de potássio na contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite e de queijo Minas frescal**

As amostras analisadas neste teste foram leite cru, leite submetido a tratamento térmico a 68°C por 2 minutos, queijo Minas frescal e queijo Minas frescal tratado termicamente (80°C por 5 minutos). Os tratamentos térmicos realizados nas amostras visaram à destruição de grande parte da microbiota naturalmente encontrada nestes alimentos.

Utilizando-se inóculo preparado conforme descrito em 4.2.1, efetuaram-se contagens nos vários meios de forma idêntica à descrita em 4.2.3, exceto que os meios empregados foram adicionados de 0,05mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio, conforme preconizado por Zadik *et al.* (1993) para utilização no ágar MacConkey sorbitol.

Nas placas apresentando colônias suspeitas, procedeu-se ao isolamento e identificação das culturas conforme descrito em 4.2.3.

Para verificar se houve diferenças entre os ensaios, foi realizado o teste de Tukey em nível de significância de 5%.

#### **4.2.5. Avaliação da técnica do Número Mais Provável (NMP) na contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal**

O inóculo de *E. coli* O157:H7 foi preparado conforme descrito em 4.2.1.

Alíquotas de 25 g de queijo Minas frescal tratadas termicamente (80°C durante 5 minutos em banho-maria) e não submetidas a tratamento térmico foram inoculadas com 2,0 mL do inóculo ( $10^2$  UFC/mL). A seguir foram deixadas em repouso a 4°C durante 2 horas e, em continuação, foram homogeneizadas em 225 mL de tampão citrato 2%, em homogeneizador de pistões por 2 minutos. Fizeram-se as diluições decimais (até  $10^{-4}$ ) e 1 mL de cada diluição foi inoculado em três tubos contendo 10 mL de caldo mEC (Okrend & Rose (1989), citados por Johnson *et al.*, 1995) e 10 mL de caldo mTSB (Padhye & Doyle, 1991), com incubação a 35°C por 24-48 horas. Os tubos de caldo mEC foram observados quanto à turvação e produção de gás e os de caldo mTSB, quanto à turvação.

A partir dos tubos positivos, semearam-se por estrias de esgotamento em placas contendo os meios de ágar MSCT, MSDACT, HCCT, MEMBCT e Rainbow+nCT, sendo as placas incubadas a 35°C por 24-48 horas. A confirmação das colônias típicas foi feita conforme descrito no item 4.2.3.

Este ensaio foi realizado com cinco repetições.

#### **4.2.6. Avaliação de técnicas de detecção de *E. coli* O157:H7, inoculada experimentalmente em amostras de leite e queijo Minas frescal**

##### **A. Comparação entre os meios mEC+n e BPW+3 antibióticos)**

O inóculo foi preparado conforme descrito em 4.2.1. Quatro alíquotas de 25g de queijo, duas submetidas a tratamento térmico (80°C por 5 minutos) e as

restantes sem tratamento térmico foram inoculadas com 2,0 mL da diluição  $10^{-5}$  do inóculo ( $10^2$  UFC/g). Uma amostra tratada termicamente e a outra sem tratamento térmico foram homogeneizadas em 225 mL de Caldo mEC+n (Okrend & Rose (1989), citados por Johnson *et al.*, 1995) e as outras duas, em 225 mL de BPW+3 antibióticos (Blanco *et al.*, 1996), todas contidas em frascos Erlenmeyer de 500 mL.

Amostras de leite, em número de quatro, sendo duas delas submetidas a tratamento térmico (68°C por 2 minutos) e duas sem tratamento térmico também receberam 2,0 mL da diluição  $10^{-5}$  do inóculo de *E. coli* O157:H7, sendo a seguir homogeneizadas com 225 mL de mEC+n e 225 mL de BPW+3 antibióticos, de forma idêntica à descrita para os queijos.

Todas as amostras foram incubadas em agitador tipo orbital (“shaker”) a 120 rpm a 35-36°C por 6 horas. Após esse período, os frascos foram transferidos para estufa incubadora estática e completado o enriquecimento a 35-37°C por 18 horas.

Terminada a incubação, as amostras foram diluídas em série em tampão citrato 2% até diluição  $10^{-6}$ . As diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram inoculadas, em duplicata, na superfície de meios MSMA e MSCT e incubadas a 42°C e a 35°C, respectivamente, por 24 horas. A confirmação das colônias suspeitas foi efetuada de maneira idêntica à descrita em 4.2.3.

Este experimento foi realizado 3 vezes para as amostras de queijo Minas e quatro vezes para as de leite.

## **B. Comparação entre os meios mEC+n e mTSB**

O procedimento experimental foi idêntico ao descrito no ensaio 4.2.6.A, exceto pela utilização do caldo mTSB em substituição ao caldo BPW+3 antibióticos.

Para detectar se houve diferenças entre os caldos de enriquecimento e os meios sólidos empregados na detecção de *E. coli* O157:H7 foi empregado o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

#### **4.2.7. Avaliação da sensibilidade do sistema TECRA *E. COLI* VIA e dos métodos de Okrend & Rose e da FDA na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal**

Porções contendo aproximadamente 200g de cada amostra de queijo foram homogeneizadas por dois minutos em equipamento Stomacher 400 Lab Blender. Após homogeneização, unidades analíticas de 25 g foram inoculadas com 2 mL ( $10^2$  UFC/g) de inóculo preparado de acordo com item 4.2.1, sendo analisadas através de três métodos diferentes, a saber:

##### **4.2.7.1. Metodologia segundo Okrend & Rose**

O procedimento realizado foi idêntico ao descrito no item 4.2.6.A., sendo as colônias suspeitas submetidas à confirmação conforme item 4.2.3.

##### **4.2.7.2. Metodologia preconizada pela FDA**

Uma alíquota de 25 g de queijo foi homogeneizada em “stomacher” por 2 minutos com 225 mL de caldo EHEC-EEB, procedendo-se a incubação a 35-37°C em “shaker a 120 C rpm. Após 6 horas de incubação, retirou-se uma alçada do caldo de enriquecimento, a qual foi estriada por esgotamento em ágar MSCT e 0,1 mL foi semeado na superfície de ágar MSCT. As placas de MSCT foram incubadas a 35°C/24h e o frasco contendo o caldo de enriquecimento reincubado sob as mesmas condições por 18 horas.

Não havendo colônias típicas nas placas de MSCT, retirava-se uma nova alçada e 0,1 mL do caldo de enriquecimento incubado a 24 horas, estriando-se novamente em ágar MSCT e semeando-se em superfície de ágar MSCT, respectivamente. Também foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-6}$  em solução

de citrato 2% do caldo enriquecido por 24 h e semeou-se 0,1 mL em duplicata das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  na superfície de ágar MSCT com incubação  $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ .

As colônias típicas foram submetidas à confirmação de acordo com item 4.2.3.

#### **4.2.7.3. Detecção de *E. coli* O157 através do kit TECRA *E. COLI* O157 VIA**

Empregou-se a metodologia recomendada pelo fabricante, utilizando-se 225 mL de meio BTSSB+n para homogeneização de 25g de amostra e posterior detecção do patógeno

Estrias por esgotamento foram realizadas, a partir do meio BTSSB+n para as amostras positivas, em ágar MSCT e estas placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ . A seguir, as colônias típicas foram submetidas aos testes de confirmação descritos em 4.2.3.

Como não foi possível isolar colônias típicas a partir do ágar MSCT para algumas amostras, face ao grande número de contaminantes presentes nas placas, passou-se, então a diluir em série o meio BTSSB+n enriquecido até  $10^{-6}$  em tampão citrato a 2%, semeando-se 0,1 mL das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  em ágar MSCT, incubando-se a  $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$  e confirmando-se as colônias típicas como no item 4.2.3.

#### **4.2.8. Ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras comerciais de queijo Minas frescal**

Conforme citado no item 4.1. Material, foram analisadas um total de 60 amostras de queijo Minas frescal, de diferentes marcas comerciais, com e sem registro no Ministério da Agricultura.

Empregaram-se as metodologias preconizadas por Okrend & Rose (1989), FDA (1998) e TECRA<sup>®</sup> - Austrália, descritas no item 4.2.7.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Teste de resistência de *E. coli* O157:H7 à novobiocina

Em ensaios preliminares, verificou-se que a concentração de 100 mg/L de novobiocina incorporada ao ágar Rainbow, conforme recomendação do fabricante (Biolog - Austrália), era altamente inibitória à cepa de *E. coli* O157:H7 em estudo. Constatou-se uma redução ao redor de 5 ciclos log nas contagens observadas nesse meio sem e com antibiótico. Assim sendo, decidiu-se avaliar a resistência desta espécie frente a diferentes concentrações de novobiocina.

Os resultados contidos na **Tabela 5** demonstraram que a cepa de *E. coli* O157:H7 utilizada teve bom desenvolvimento em caldo TSB adicionado de 10 a 30 mg/L de novobiocina. A partir dessa concentração, não foi observada turvação, ou seja, evidência de crescimento no caldo de cultivo.

**Tabela 5.** Comportamento de *E. coli* O157 frente a várias concentrações de novobiocina

TUBO	Concentração de novobiocina (mg/L)	Crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7
1	10	+
2	20	+
3	30	+
4	40	-
5	50	-
6	60	-
7	70	-
8	80	-
9	90	-
10	100	-

A partir dos resultados obtidos nestes testes, optou-se pela adição de 20 mg/L de novobiocina ao meio Rainbow, em vez de 100 mg/L, conforme concentração sugerida inicialmente pelo fabricante.

## **5.2. Comportamento de *E. coli* O157:H7 e da microbiota do queijo Minas frescal sob ação de antibióticos**

A **Tabela 6** demonstra que a cepa de *E. coli* O157:H7 utilizada neste trabalho resistiu às concentrações máximas de 24 mg/L de vancomicina, 0,30 mg/L de cefsulodina e 0,15 mg/L de cefixima, adicionadas conjuntamente ao caldo TSB. No entanto, a microbiota do queijo utilizado no teste mostrou-se muito mais resistente, tolerando elevadas concentrações dos antibióticos vancomicina, cefsulodina e cefixima, tais como 120 mg/L, 150mg/L e 0,75mg/L, respectivamente.

Esta constatação é preocupante quando se considera o uso indiscriminado e indevido de antibióticos na alimentação animal ou tratamento de infecções. Embora sem haver uma caracterização das espécies presentes nas amostras, sabe-se que ela é constituída, em grande parte, de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, na qual o desenvolvimento de formas resistentes a antibióticos é freqüentemente descrito. Além disso, esta constatação compromete a eficiência e o desempenho de meios, nos quais a seletividade é conferida pela adição de antibióticos.

**Tabela 6.** Comportamento de *E. coli* O157:H7 e da microbiota natural de queijo Minas fresco frente à ação conjunta de três antibióticos, em diferentes concentrações

Tubo	Antibióticos adicionados (mg/L)			Crescimento (turbidez)	
	Vancomicina	Cefsulodina	Cefixima	<i>E. coli</i> O157:H7	Microbiota natural
1	8	10	0,05	+	+
2	12	15	0,075	+	+
3	16	20	0,10	+	+
4	24	30	0,15	+	+
5	32	40	0,20	-	+
6	40	50	0,25	-	+
7	48	60	0,30	-	+
8	56	70	0,35	-	+
9	64	80	0,40	-	+
10	72	90	0,45	-	+
11	80	100	0,50	-	+
12	120	150	0,75	-	+

### 5.3. Avaliação da seletividade e recuperação de *E. coli* O157:H7 em cinco meios de contagem utilizados na análise de queijo Minas fresco e leite cru

O teste de contagem de *E. coli* O157:H7 nas amostras de queijo Minas não submetidas a tratamento térmico e inoculadas experimentalmente, com inóculo variando entre  $4,3 \times 10^2$  a  $5,2 \times 10^2$  UFC/g não forneceu resultados satisfatórios nos cinco meios seletivos testados. Todas as placas preparadas continham um número muito elevado de contaminantes, sugerindo portanto, a baixa seletividade e poder de diferenciação dos meios empregados.

As colônias atípicas nos diferentes meios de cultura apresentaram as seguintes características: ágar MSMA: colônias de cor rosa escuro ("pink"), por serem sorbitol positivas, com diâmetro variando entre 1 e 2 mm, algumas cremosas; ágar HC: colônias amarelas, de diâmetro entre 1 e 2 mm; ágar MSDA: colônias amarelas, com diâmetro entre 1 e 2 mm; ágar MEMB: colônias de cor púrpura ou negras com ou sem brilho verde metálico, com 1mm de diâmetro; ágar Rainbow+n: colônias de cor violeta, azuis e/ou amarelas, de diferentes tamanhos.

Nas amostras de leite cru inoculadas experimentalmente com *E. coli* O157:H7, com inóculos variando de  $4,7 \times 10^2$  a  $5,4 \times 10^2$  UFC/mL, também não foi possível realizar a contagem pelos mesmos motivos descritos anteriormente.

Diante dos resultados insatisfatórios nos ensaios de contagem de *E. coli* O157:H7, partiu-se, então, para um novo estudo, utilizando-se os mesmos meios de cultura, mas suplementados com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio.

#### **5.4. Avaliação da seletividade e recuperação de *E. coli* O157:H7 em cinco meios de contagem suplementados com cefixima e telurito de potássio**

Em amostras de queijo que não foram tratadas termicamente, a adição de cefixima e telurito de potássio, nas concentrações propostas, aos meios de cultura utilizados na contagem de *E. coli* O157:H7 também ineficiente, uma vez que em nenhum deles foi possível realizar a contagem, devido ao grande número de contaminantes.

Já nas amostras submetidas a tratamento térmico, a microbiota acompanhante presente no queijo foi significativamente reduzida possibilitando, assim, o crescimento de *E. coli* O157:H7 em todos os meios utilizados na contagem. Esses resultados reforçam a afirmação de que esta cepa de *E. coli* O157:H7 utilizada é um fraco competidor, sendo inibida em seu desenvolvimento na presença de uma microbiota contaminante elevada.

De acordo com a **Tabela 7**, verifica-se que o meio Rainbow+nCT foi o que se mostrou menos favorável ao crescimento dessa bactéria, seguido do meio MSCT. Respectivamente 94,1% e 84,7% da população inicialmente inoculada não foram recuperadas. Estes resultados sugerem que os dois meios não seriam indicados na contagem de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijos, mesmo em situações favoráveis, com baixos números de microrganismos competitivos presentes. Os outros meios - HCCT, MSDACT e MEMBCT - não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quanto à capacidade de recuperação do inóculo, apesar das aparentes diferenças absolutas nas contagens. No entanto, o meio MEMBCT, além de inibir ligeiramente *E. coli* O157:H7, necessitou de, no mínimo, 40 horas de incubação a 35°C para que as colônias adquirissem um tamanho de 1 mm e pudessem ser melhor identificadas.

Observando-se a **Tabela 8**, verifica-se que a contagem de *E. coli* O157:H7 em leite cru, nos meios suplementados com cefixima e telurito, somente foi possível em um dos três testes realizados. Observou-se redução expressiva do número de células inicialmente inoculadas no ágar Rainbow+nCT.

Todas as colônias típicas submetidas à confirmação nos meios PRS-MUG e EMB e kit CRYSTAL - BBL forneceram resultados positivos para *E. coli* O157:H7, ou seja, de cor rósea, sem desenvolvimento de cor azul sob luz UV no PRS-MUG e de cor escura com brilho verde metálico no EMB.

Nas outras duas amostras de leite cru, os contaminantes, por não terem sido inibidos nos meios de cultura utilizados, mascararam as colônias de *E. coli* O157:H7.

**Tabela 7.** Contagem de *E. coli* O157:H7, inoculada experimentalmente em amostras de queijo tipo Minas-frescal tratadas a 80°C/5 minutos, e recuperação do inóculo inicial

Ensaio	Contagens (UFC/g) e porcentagem de recuperação, em diferentes meios											
	Inoculo Inicial (UFC/g)		MSCT		HCCT		MSDACT		MEMBCT		RW+nCT	
	Valor	%	Valor	%	Valor	%	Valor	%	Valor	%	Valor	%
1	5,1x10 <sup>2</sup>	16,7	4,8x10 <sup>2</sup>	94,1	4,3x10 <sup>2</sup>	84,3	3,7x10 <sup>2</sup>	72,5	2,8x10 <sup>1</sup>	5,5		
2	4,2x10 <sup>2</sup>	18,3	4,3x10 <sup>2</sup>	102,4	4,6x10 <sup>2</sup>	109,5	2,7x10 <sup>2</sup>	64,3	2,3x10 <sup>1</sup>	5,5		
3	4,5x10 <sup>2</sup>	12,2	4,1x10 <sup>2</sup>	91,1	4,1x10 <sup>2</sup>	91,1	3,1x10 <sup>2</sup>	68,9	3,0x10 <sup>1</sup>	6,7		
Média	4,6x10 <sup>2</sup>	15,7 <b>b</b>	4,4x10 <sup>2</sup>	95,9 <b>c</b>	4,3x10 <sup>2</sup>	95,0 <b>c</b>	3,2x10 <sup>2</sup>	68,6 <b>c</b>	2,7x10 <sup>1</sup>	5,9 <b>a</b>		

MSCT: Ágar MacConkey sorbitol + MUG + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

HCCT: Ágar HC + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

MSDACT: Ágar SD-39 modificado + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

MEMBCT: Ágar eosina azul de metileno Levine modificado 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

Rw+nCT: Ágar Rainbow O157 + 20mg/L novobiocina + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey (p < 0,05)

**Tabela 8.** Contagem de *E. coli* O157:H7 experimentalmente inoculada em amostras de leite cru e recuperação do inóculo inicial

Ensaio	Inóculo Inicial (UFC/mL)	Contagens (UFC/mL) em diferentes meios de cultura											
		MSCT		HCCT		MSDACT		MEMBCT		Rw+nCT			
		Valor	%	Valor	%	Valor	%	Valor	%	Valor	%		
1	$4,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	36,6	$3,8 \times 10^2$	92,7	$3,3 \times 10^2$	80,5	$1,7 \times 10^2$	41,5	$4,2 \times 10^1$	10,2		
2	$5,1 \times 10^2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(a)		
3	$4,5 \times 10^2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(a)		

- : contagem inviável devido ao intenso crescimento da microbiota acompanhante  
 MSCT: Ágar MacConkey sorbitol + MUG + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito  
 HCCT: Ágar HC + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito  
 MSDACT: Ágar SD-39 modificado + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito  
 MEMBCT: Ágar eosina azul de metileno Levine modificado 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito  
 Rw+CT: Ágar Rainbow O157 + 20mg/L novobiocina + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

Através dos dados apresentados na **Tabela 9**, nota-se que o meio HCCT apresentou desempenho semelhante ao MSDACT e ao MEMBCT e superior aos apresentados pelos meios MSCT e Rainbow+nCT, quanto à recuperação de *E. coli* O157:H7 nas amostras de leite tratadas termicamente. Não houve diferença significativa entre os meios MSCT e Rainbow+nCT. Também foi possível verificar que as contagens no ágar MSDACT sofreram variações muito grandes (entre 39,0 e 91,1% de recuperação).

### **5.5. Avaliação da Contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em Queijo Minas frescal, através da Técnica do Número Mais Provável (NMP)**

De acordo com os dados da **Tabela 10**, as contagens de *E. coli* O157:H7 pela técnica do Número Mais Provável, mediante inoculação experimental em amostras de queijo tratadas termicamente, foram semelhantes nos caldos mEC e mTSB.

Todas as colônias típicas isoladas dos meios seletivos foram confirmadas como *E. coli* O157:H7 somente após serem submetidas aos testes em PRS-MUG, EMB e identificação bioquímica em kit CRYSTAL - BBL.

Os resultados também indicaram que a recuperação de *E. coli* O157:H7, independentemente do meio utilizado, não foi satisfatória, geralmente com redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos frente ao inóculo inicial. É evidente que a técnica de NMP fornece apenas uma estimativa da população, mas os resultados obtidos mostraram, invariavelmente, uma redução nas contagens comparativamente ao inóculo experimentalmente inoculado.

Nos ensaios em que se avaliaram amostras de queijo não tratadas termicamente, os resultados foram bastante insatisfatórios, praticamente não havendo recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em níveis iniciais de  $3,0 \times 10^2$  a  $1,4 \times 10^3$  UFC/g. Estes resultados, aliados às dificuldades inerentes ao método NMP, sugerem que o uso desta técnica não seria uma alternativa recomendável para a pesquisa de *E. coli* O157:H7 em queijos.

**Tabela 9.** Contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite tratado termicamente (68°C/2 minutos), em diferentes meios de cultura suplementados com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio, e recuperação do inóculo inicial

Ensaio	Inóculo Inicial (UFC/g)	CONTAGENS (UFC/mL)													
		MSCT			HCCT			MSDACT			MEMBCT			RW+nCT	
		Valor	%*	Valor	%*	Valor	%*	Valor	%*	Valor	%*	Valor	%		
1	4,1x10 <sup>2</sup>	3,7x10 <sup>1</sup>	9,0	3,3x10 <sup>2</sup>	80,5	1,6x10 <sup>2</sup>	39,0	1,8x10 <sup>2</sup>	43,9	5,9x10 <sup>1</sup>	14,1				
2	5,1x10 <sup>2</sup>	8,3x10 <sup>1</sup>	16,3	4,3x10 <sup>2</sup>	84,3	2,3x10 <sup>2</sup>	45,1	2,3x10 <sup>2</sup>	45,1	7,3x10 <sup>1</sup>	14,3				
3	4,5x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	4,7	4,1x10 <sup>2</sup>	91,1	4,1 10 <sup>2</sup>	91,1	1,7x10 <sup>2</sup>	37,8	5,8x10 <sup>1</sup>	12,9				
<b>Média</b>	4,6x10 <sup>2</sup>	4,3x10 <sup>1</sup>	10,0 a	3,9x10 <sup>2</sup>	85,3 c	2,7x10 <sup>2</sup>	58,4 bc	1,9x10 <sup>2</sup>	42,3 bc	6,3x10 <sup>1</sup>	13,8 ab				

MSCT: Ágar MacConkey sorbitol + MUG + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

HCCT: Ágar HC + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

MSDACT: Ágar SD-39 modificado + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

MEMBCT: Ágar eosina azul de metileno Levine modificado 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

Rw+CT: Ágar Rainbow O157 + 20mg/L novobiocina + 0,05mg/L cefixima + 2,5 mg/L telurito

UFC/mL = unidade formadora de colônia por mililitro

\*: percentagem em relação ao inóculo inicial

Porcentagens seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey (p < 0,05)

**Tabela 10.** Uso da técnica do Número Mais Provável (NMP) na contagem de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras pasteurizadas de queijo Minas frescal

Ensaio	Inóculo inicial (UFC/g)	Diluição	Tubos positivos*/tubos analisados		NMPc /g <sup>(a)</sup>	
			mEC	mTSB	mEC	mTSB
1	$5,4 \times 10^2$	$10^{-1}$	3/3	3/3	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
		$10^{-2}$	0/3	0/3		
		$10^{-3}$	0/3	0/3		
2	$3,0 \times 10^2$	$10^{-1}$	3/3	3/3	$9,3 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$
		$10^{-2}$	2/3	0/3		
		$10^{-3}$	0/3	1/3		
3	$6,2 \times 10^2$	$10^{-1}$	3/3	3/3	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
		$10^{-2}$	0/3	0/3		
		$10^{-3}$	0/3	0/3		
4	$4,6 \times 10^2$	$10^{-1}$	3/3	3/3	$2,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$
		$10^{-2}$	0/3	1/3		
		$10^{-3}$	0/3	0/3		
5	$1,4 \times 10^3$	$10^{-1}$	3/3	3/3	$2,4 \times 10^1$	$4,6 \times 10^1$
		$10^{-2}$	3/3	3/3		
		$10^{-3}$	0/3	1/3		

\* Tubos positivos: com produção de gás e/ou turvação

(a): Interpretação de Tabela de NMP (Bacteriological Analytical Manual - FDA, 1984)

NMPc/g = número mais provável confirmado por grama

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/l de novobiocina

mTSB = caldo tripton e soja suplementado com casaminoácidos e 10 mg/L de acriflavina

### 5.6. Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite e queijo Minas frescal, submetidas ou não a tratamento térmico

De acordo com a **Tabela 11**, verifica-se que as amostras de queijo tratadas termicamente e inoculadas com populações na faixa de  $8 \times 10^2$  (2,58 log) a  $5,4 \times 10^2$  (2,73 log) UFC de *E. coli* O157:H7 por grama, apresentaram aumentos médios de 5,83 e 5,01 ciclos logarítmicos nas contagens, respectivamente quando cultivadas em caldo mEC+n e em BPW+3 antibióticos.

Analisando-se individualmente cada caldo de enriquecimento utilizado, não se observaram diferenças devidas ao meio seletivo de semeadura. Entretanto, o uso do BPW+3 antibióticos seguido de MSCT mostrou menor taxa de recuperação do inóculo em comparação ao uso do mEC, seguido de semeadura em MSMA ou mesmo em MSCT.

Os resultados relativos à recuperação de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijo não submetidas a aquecimento constam da **Tabela 12**. Neste caso, nenhuma diferença foi observada devida aos caldos de enriquecimento nem aos meios de ágar testados.

Em se tratando de uma análise qualitativa, a adequada seletividade e diferenciação proporcionadas pelo meio são de importância fundamental e, nestes aspectos, o desempenho do meio MSCT foi superior. Neste meio, poucas colônias atípicas se desenvolveram, ao contrário do que foi observado no meio MSMA. Disso decorre a sugestão de que a metodologia para isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijo se desenvolva utilizando, para semeadura em superfície, o ágar MSCT. Considerando os resultados observados para as amostras de queijo submetidas a tratamento térmico, o caldo mEC+n seria igualmente aconselhável, devido ao seu menor potencial de inibição.

**Tabela 11.** Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo tratadas termicamente (80°C/5min), em função do meio de enriquecimento e do meio seletivo de isolamento

Ensaio	Inóculo Inicial log UFC/mL	ENRIQUECIMENTO						mEC
		BPW + 3 antibióticos			Contagens (log UFC/g)			
		Contagens (log UFC/g)			Contagens (log UFC/g)			
		MSMA (42°C)*	MSCT (37°C)*	MSCT (37°C)*	MSMA (42°C)*	MSCT (37°C)*	MSCT (37°C)*	
Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	
1	2,58	4,14	6,59	4,01	8,52	5,94	7,36	4,78
2	2,73	4,89	7,23	4,50	8,67	5,94	8,40	5,67
3	2,71	6,00	6,32	3,61	8,32	5,61	7,76	5,05
<b>Média</b>	2,63	5,01 <b>ab</b>	6,71	4,04 <b>a</b>	8,50	5,83 <b>b</b>	7,84	5,17 <b>b</b>

UFC/g = unidade formadora de colônia por grama

BPW+3antibióticos = Água tamponada peptonada com 8 mg/L vancomicina, 10 mg/L de novobiocina e 0,05 mg/L de cefixima

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA = Agar MacConkey sorbitol +MUG

MSCT = Agar MacConkey sorbitol + MUG com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio

\*Acresc = aumento (em log UFC/g) frente ao inóculo inicial

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey (p < 0,05)

**Tabela 12.** Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo não submetidas a tratamento térmico em função do meio de enriquecimento e do meio seletivo de isolamento

Ensaio	Inóculo Inicial log UFC/mL	ENRIQUECIMENTO									
		BPW + 3 antibióticos					mEC				
		Contagens (log UFC/g)					Contagens (log UFC/g)				
		MSMA (42°C)		MSCT (37°C)		MSCT (37°C)	MSMA (42°C)		MSCT (37°C)		MSCT (37°C)
Valor	Acresc.*	Valor	Acresc.*	Valor	Acresc.*	Valor	Acresc.*	Valor	Acresc.*		
1	2,58	(<5,00)	-	(<5,00)	-	(<5,00)	-	6,73	4,15		
2	2,73	7,53	4,80	7,41	4,68	8,41	5,68	8,28	5,55		
3	2,71	6,57	3,86	6,65	3,94	7,58	4,87	6,32	3,61		
<b>Média</b>	2,67	7,05	4,33 a	7,03	4,31 a	8,00	3,52 a	7,11	4,44 a		

Valores entre parênteses: Havia somente colônias atípicas, de cor rosa escuro, nas placas de MSMA.

UFC/g = unidade formadora de colônia por grama

BPW+3 antibióticos = Água tamponada peptonada com 8 mg/L vancomicina, 10 mg/L de novobiocina e 0,05 mg/L de cefixima

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA = Ágar MacConkey sorbitol +MUG

MSCT = Ágar MacConkey sorbitol + MUG com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio

\*Acresc = aumento das contagens frente ao inóculo inicial

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey (p < 0,05)

Segundo os dados apresentados na **Tabela 13**, observa-se que o enriquecimento das amostras de leite tratadas termicamente em caldo mEC+n, associado à sementeira em MSMA, permitiu evidente recuperação da população de *E. coli* O157:H7 (inicialmente com valor médio de 2,63 log UFC/mL), exibindo um crescimento ao redor de seis ciclos logarítmicos. Este resultado é superior ao apresentado pelo emprego de BPW+3 antibióticos com qualquer dos dois meios de sementeira, porém não difere do que se observou para a associação de mEC+n com MSCT.

Os resultados relativos a leite não submetido a tratamento térmico estão apresentados na **Tabela 14**. Os valores obtidos evidenciaram que os meios utilizados, em quaisquer combinações, ofereceram resultados equivalentes, no que se refere à multiplicação da bactéria inoculada.

Considerando o conjunto de resultados obtidos nos ensaios com leite, cabe afirmar que o caldo mEC+n apresenta desempenho adequado para utilização em experimentos de isolamento de *E. coli* O157:H7, enquanto o MSCT demonstrou ser um meio de sementeira que contribui eficientemente para inibir a microbiota competidora.

**Tabela 13.** Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite submetidas a tratamento térmico (68°C/2min) em função do meio de enriquecimento e do meio seletivo de isolamento

Ensaio	Inóculo Inicial log UFC/mL	ENRIQUECIMENTO									
		BPW + 3 antibióticos					MEC				
		Contagens (log UFC/g)					Contagens (log UFC/g)				
		MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSCT	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSCT
Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.		
1	2,86	7,94	5,08	7,82	4,96	8,59	5,73	6,32	3,46		
2	2,64	7,38	4,74	6,88	4,24	8,94	6,30	8,20	5,56		
3	2,64	7,41	4,77	7,11	4,47	8,43	5,79	8,57	5,93		
4	2,36	7,59	5,23	7,57	5,21	8,52	6,16	8,36	6,00		
<b>Média</b>	2,63	7,58	4,96 <b>a</b>	7,35	4,72 <b>a</b>	8,62	6,00 <b>b</b>	7,86	5,24 <b>ab</b>		

UFC/mL = unidade formadora de colônia por grama

BPW+3antibióticos = Água tamponada peptonada com 8 mg/L vancomicina, 10 mg/L de novobiocina e 0,05 mg/L de cefixima

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA = Ágar MacConkey sorbitol +MUG

MSCT = Ágar MacConkey sorbitol + MUG com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio

Acresc.: incremento na população frente ao inóculo inicial

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

**Tabela 14.** Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru, em função do meio de enriquecimento e do meio seletivo de isolamento

Ensaio	Inóculo Inicial log UFC/mL	ENRIQUECIMENTO							
		BPW + 3 antibióticos				mEC			
		Contagens (log UFC/g)		MSCT (37°C)		Contagens (log UFC/g)		MSCT (37°C)	
		MSMA (42°C)	MSCT (42°C)	MSMA (42°C)	MSCT (42°C)	MSMA (42°C)	MSCT (42°C)	MSMA (42°C)	MSCT (42°C)
		Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.
1	2,86	7,57	4,71	7,60	4,74	8,49	5,63	6,11	3,25
2	2,64	7,86	5,22	7,11	4,47	8,81	6,17	8,52	5,88
3	2,64	7,40	4,76	7,67	5,03	7,69	5,05	7,86	5,22
4	2,36	7,38	5,02	7,54	5,18	8,34	5,98	8,20	5,84
<b>Média</b>	2,63	7,55	4,93 a	7,48	4,86 a	8,33	5,71 a	7,67	5,05 a

UFC/mL = unidade formadora de colônia por grama

BPW+3antibióticos = Água tamponada peptonada com 8 mg/L vancomicina, 10 mg/L de novobiocina e 0,05 mg/L de cefixima

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA = Ágar MacConkey sorbitol +MUG

MSCT = Ágar MacConkey sorbitol + MUG com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de teluriot de potássio

Acresc. = incremento na população frente ao inóculo inicial

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Na seqüência dos experimentos, o enriquecimento em caldo mEC + n, que revelou um desempenho satisfatório, foi comparado em relação a um terceiro caldo de enriquecimento, o mTSB, proposto por Padhye & Doyle (1991). Nesta fase, o desempenho foi avaliado em amostras de queijo Minas frescal, submetidas ou não a tratamento térmico antes da inoculação experimental com *E. coli* O157:H7.

De acordo com a **Tabela 15**, verifica-se que as amostras de queijo submetidas a tratamento térmico inoculadas com população média de de *E. coli* O157:H7 da ordem de 2,73 log UFC/g, enriquecidas em mTSB a 35°C por 24 horas, apresentaram um aumento médio de 5,40 ciclos logarítmicos nas contagens, enquanto que nas enriquecidas em caldo mEC+n o aumento situou-se em 5,67 ciclos logarítmicos. Segundo a análise estatística desses dados, não se registrou diferença entre os caldos mTSB e mEC, quanto às porcentagens de recuperação do inóculo, em se tratando de semeadura em meio MSMA. A diferença observada restringiu-se, portanto, ao meio seletivo empregado após enriquecimento em mTSB: neste caso, o meio MSCT apresentou a menor taxa de recuperação.

Diante dessa observação, acredita-se que a adição de cefixima e de telurito de potássio, nas concentrações utilizadas, influenciou negativamente no crescimento de *E. coli* O157:H7 em meio MSCT. Por outro lado, sua maior seletividade garantiu menor proporção de colônias atípicas nas placas.

Novamente, ocorreu intenso desenvolvimento de colônias atípicas no ágar MSMA. Assim sendo, a partir dessas observações, há indicação de que para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijo, o enriquecimento em caldo mEC e posterior semeadura em ágar MSCT seria a melhor opção.

A análise estatística dos resultados permitiu verificar que houve diferença significativa entre os meios MSMA e MSCT, após enriquecimento em caldo mTSB. Os resultados relativos ao caldo mEC+n, entretanto, apontaram equivalência entre os meios seletivos de semeadura.

**Tabela 15.** Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas fresco tratadas termicamente (80°C/5min), em função do caldo de enriquecimento e do meio seletivo de isolamento

Ensaio	Inóculo Inicial log UFC/mL	ENRIQUECIMENTO									
		MTSB					mEC				
		Contagens (log UFC/g)					Contagens (log UFC/g)				
		MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSCT (37°C)
Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.		
1	2,73	8,30	5,57	7,89	5,16	8,59	5,86	8,56	5,83		
2	2,79	7,96	5,17	7,61	4,82	8,40	5,61	8,23	5,44		
3	2,65	8,25	5,60	7,92	5,27	8,43	5,78	8,04	5,39		
4	2,73	8,00	5,27	7,62	4,89	8,15	5,42	7,94	5,21		
<b>Média</b>	2,73	8,13	5,40 <b>b</b>	7,76	5,04 <b>a</b>	8,39	5,67 <b>b</b>	8,19	5,47 <b>b</b>		

UFC/g = unidade formadora de colônia por grama

mTSB = caldo tripton soja suplementado com casaminoácidos e 10 mg/L de acriflavina

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA = Agar MacConkey sorbitol +MUG

MSCT = Agar MacConkey sorbitol + MUG com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio

Acrésc.: incremento na população frente ao inóculo inicial

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A **Tabela 16** exibe os resultados de crescimento de *E. coli* O157:H7 observados em amostras de queijo Minas frescal não submetidas ao tratamento térmico. O ágar MSMA apresentou melhores resultados quando usado em associação ao caldo mEC+n. Os resultados observados para o ágar MSCT, seja após enriquecimento em caldo mTSB ou em caldo mEC+n, foram iguais.

**Tabela 16.** Recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal sem tratamento térmico, em função do caldo de enriquecimento e do meio seletivo de isolamento

Ensaio	Inóculo Inicial log UFC/mL	ENRIQUECIMENTO									
		mTSB					mEC				
		Contagens (log UFC/g)					Contagens (log UFC/g)				
		MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSCT	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSMA (42°C)	MSCT (37°C)	MSCT
Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.	Valor	Acresc.		
1	2,73	2,97	6,18	3,45	6,60	3,87	6,58	3,85			
2	2,79	3,61	6,45	3,66	6,93	4,14	7,28	4,49			
3	2,65	2,83	5,40	2,75	-**	-	5,74	3,09			
4	2,73	-	6,30	3,57	7,08	4,35	6,92	4,19			
<b>Média</b>	2,73	3,14 <b>a</b>	6,08	3,36 <b>ab</b>	6,87	4,12 <b>b</b>	6,63	3,91 <b>ab</b>			

\* Típicas em ágar MSMA, e sorbitol e glicuronidase negativas, porém não confirmadas em EMB

\*\* Típicas em ágar MSMA, porém não confirmadas em PRS-MUG nem em EMB

UFC/g = unidade formadora de colônia por grama

mTSB = caldo triptona e soja suplementado com casaminoácidos e 10 mg/L de acriflavina

mEC = caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA = Ágar MacConkey sorbitol +MUG

MSCT = Ágar MacConkey sorbitol + MUG com 0,05 mg/L de cefixima e 2,5 mg/L de telurito de potássio

Acresc. = incremento na população frente ao inóculo inicial; (a) = média calculada somente entre três valores

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente, segundo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 5.7. Comparação do desempenho do TECRA *E. COLI* O157 VIA com as metodologias da FDA e de Okrend & Rose na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal

Pela análise da Tabela 17, pode-se observar que das 12 amostras de queijo inoculadas, contendo entre  $1,7 \times 10^1$  a  $6,0 \times 10^2$  UFC de *E. coli* O157:H7/g, 10 (83,3%) apresentaram resultados positivos. As 2 amostras com resultados falso-negativos continham quantidade relativamente baixa de células da bactéria em estudo ( $2,8 \times 10^1$  e  $3,9 \times 10^1$  UFC/g). Pode ter ocorrido uma ausência de recuperação das células de *E. coli* O157:H7 pelo uso do caldo de enriquecimento BTSB+n, o qual demonstrou pequena ação inibitória sobre a microbiota acompanhante, conforme constatado quando se pretendia isolar colônias típicas de amostras que apresentaram resultados presuntivos positivos no TECRA.

Na seqüência da avaliação, ensaios adicionais foram efetuados, comparando a metodologia TECRA com as propostas por Okrend *et al.* (1990 a) e FDA (1998).

Os dados obtidos nesse ensaio encontram-se também na Tabela 17. Verifica-se que o método preconizado pela FDA (1998) forneceu resultados positivos em cinco amostras, de um total de sete analisadas (71,4%), sendo 28,6% a percentagem de falso-negativos. Utilizando-se o método de OKREND *et al.* (1990), a concordância foi muito menor, uma vez que em apenas três amostras (42,9%) pôde ser detectada a presença da bactéria em estudo, resultando em 57,1% de falso-negativos.

Na amostra G, analisada através do método de OKREND, as colônias sorbitol negativas isoladas em MSCT mostraram-se atípicas em EMB (transparentes, sem brilho verde metálico) e no teste de indol (negativas). Alguns isolados a partir do método do FDA, apesar de serem indol positivos, não exibiram comportamento típico em EMB, sendo identificados pelo kit CRYSTAL como *Morganella morganii*; outras colônias, também sorbitol negativas, apresentaram-

se de cor negra, com brilho verde metálico em EMB, sendo, no entanto, indol negativas e foram identificadas como *Escherichia hermannii* pelo CRYSTAL.

Na amostra H, inoculada com  $2,8 \times 10^1$  UFC/g de *E. coli* O157:H7, não foi possível a recuperação do patógeno pelos três métodos. Acredita-se que, apesar da etapa de enriquecimento, a bactéria, estando em número muito reduzido comparativamente aos contaminantes naturalmente presentes, não encontrou condições favoráveis de desenvolvimento, portanto não alcançou um número detectável pelos métodos utilizados. Nas placas de MSCT, após enriquecimento em caldo mEC (OKREND, *et al.*, 1990) e em BTSB+n (TECRA) não foi possível isolar colônias sorbitol negativas, face ao número excessivo de contaminantes sorbitol positivos presentes. Nas placas de MSCT utilizadas no método do FDA foram isoladas algumas cepas sorbitol negativas e indol positivas, porém com comportamento atípico em EMB, sendo identificadas como *Morganella morganii*.

**Tabela 17.** Detecção de *E. coli* O157:H7 através dos métodos Okrend *et al.* (1990), FDA (1998) e sistema TECRA *E. COLI* O157 VIA em amostras de queijo Minas frescal inoculadas experimentalmente.

Amostra	Inóculo Inicial (UFC/g)	Metodologia		
		OKREND <i>et al.</i> (1989)	FDA (1998)	TECRA
A	5,7 X 10 <sup>2</sup>	NR	NR	+
B	2,8 X 10 <sup>1</sup>	NR	NR	+
C	6,0 X 10 <sup>2</sup>	NR	NR	+
D	3,4 X 10 <sup>2</sup>	NR	NR	+
E	3,9 X 10 <sup>1</sup>	NR	NR	-
F	4,2 X 10 <sup>1</sup>	+	+	+
G	1,7 X 10 <sup>1</sup>	-	-	+
H	2,8 X 10 <sup>1</sup>	-	-	-
I	2,9 X 10 <sup>2</sup>	+	+	+
J	2,5 X 10 <sup>2</sup>	-	+	+*
K	2,5 X 10 <sup>2</sup>	+	+	+
L	2,5 X 10 <sup>2</sup>	-	+	+

\* Não foi possível isolar colônias típicas em MSCT através de estrias por esgotamento e nem através de plaqueamento das diluições 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup>.  
NR = Este experimento não foi realizado

### 5.8. Estudo da ocorrência de *E. coli* O157:H7 em amostras comerciais de queijo Minas frescal

Foram analisadas um total de 60 amostras comerciais de queijo Minas frescal, com ou sem registro no Ministério da Agricultura. Nesta pesquisa, os métodos propostos por Okrend *et al.* (1989), citado por Jonhson *et al.* (1995), FDA (1998) e o método imunoenzimático TECRA® foram avaliados visando aumentar a possibilidade de detecção de *E. coli* O157:H7.

No entanto, em nenhuma das amostras foi confirmada a presença deste patógeno. Nos métodos culturais clássicos, os resultados foram sempre negativos; no entanto, na pesquisa pelo método TECRA, 8 amostras evidenciaram resultados preliminares positivos. Na aplicação do protocolo de isolamento e confirmação proposto pelo fabricante, pela realização de estrias por esgotamento em ágar MacConkey sorbitol não foi possível o isolamento de colônias típicas, sorbitol negativas, ficando as placas repletas pela microbiota acompanhante de colônias sorbitol positivas, conseqüentemente inviabilizando os resultados preliminares.

Além disso, em 4 amostras adicionais, com resultados preliminares positivos foi possível o isolamento de colônias sorbitol negativas em MSCT; no entanto, nos testes confirmativos realizados, estas colônias evidenciaram reação negativa para indol e pelo uso do kit bioquímico de identificação BBL CRYSTAL, foram identificadas como *Enterobacter cloacae*.

Nestas condições, o uso da metodologia TECRA na pesquisa de *E. coli* O157:H7 em queijo Minas frescal merece uma mais completa avaliação. É possível a ocorrência de reações cruzadas, comprometendo a especificidade do método, ou a quantidade de células de *E. coli* O157:H7 originalmente presente nas amostras pode ser tão baixa frente à microbiota competitiva acompanhante que seu isolamento nos meios seletivos seria inviabilizado.

Acredita-se que mais pesquisas sejam necessárias, como por exemplo, o estudo de diferentes meios de enriquecimento que exibam maior seletividade quando se deseje detectar esta bactéria, principalmente em alimentos cuja microbiota é elevada e muito variada.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## 6. CONCLUSÕES

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

- A cepa de *E. coli* O157:H7 utilizada neste trabalho revelou-se sensível a concentrações de novobiocina superiores a 30 mg/L, sendo desaconselhável o uso de 100 mg/L conforme preconizado em alguns meios seletivos de isolamento; além disso, ela mostrou-se menos tolerante à combinação de 3 antibióticos (cefixima, cefsulodina e vancomicina) do que a microbiota contaminante do queijo Minas frescal, tornando questionável a utilidade do uso destes antibióticos para conferir seletividade aos meios de isolamento desta bactéria.
- A adição de cefixima e telurito de potássio aos meios HCCT e MSDACT revelou-se uma alternativa adequada para a contagem de *E. coli* O157:H7 em amostras de queijo e de leite com número reduzido de microrganismos contaminantes, não evidenciando bons resultados em amostras altamente contaminadas.
- A técnica do Número Mais Provável, com emprego dos caldos mTSB e mEC não foi satisfatória para a contagem de *E. coli* O157:H7 em amostras de leite cru e de queijo inoculadas experimentalmente.
- Entre as metodologias testadas para a detecção de *E. coli* O157:H7 em queijo Minas frescal inoculado experimentalmente, nenhuma delas revelou um desempenho totalmente satisfatório. No entanto, entre as metodologias clássicas, a proposta pelo FDA (1998) foi superior, ao passo que o método imunoenzimático TECRA<sup>®</sup> foi o que comparativamente, possibilitou maior percentagem de isolamento e menor índice de resultados falso-negativos.

- Não foi detectada *E. coli* O157:H7 nas 60 amostras de queijos comerciais analisadas através dos métodos TECRA, FDA (1998) e Okrend & Rose (1990 a).
- Os resultados indicam a necessidade de aperfeiçoamento da metodologia clássica e modificada para a detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, principalmente naqueles revelando elevada contaminação por outros microrganismos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDUL-RAOUF, U.M.; AMMAR, M.S.; BEUCHAT, L.R. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, p.423-426, 1996.
2. 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 Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.2364-2368, 1993.
3. ANÔNIMO. Vítimas de bactéria no Japão chegam a 8 mil. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 22 jul. 1996. Caderno A, p.15.
4. ANSAY, S.E.; KASPAR, C.W. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.25, p.131-134, 1997.
5. ARAÚJO, V.S.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS, A.C. Análise bacteriológica do queijo Minas frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 19, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p. 283.
6. ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS Jr., J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v.8, n.1, p. 29-51, 1996.
7. ASSIS, E.M.; ROBBS, P.G.; CARVALHO, E.P. Incidência e ocorrência de injúria em *Staphylococcus aureus* nos queijos Minas frescal e mussarela comercializados em Lavras - MG. **Ciências Práticas de Lavras**, Lavras, v.15, n.4, p.339-344, out./dez., 1991.
8. BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; RÍO, M.; PRADO, C.; FERNANDÉZ, L.; BLANCO, J. Metodos empleados para la detección de ECVT en alimentos. **Alimentaria**, Madrid, p.96-99, Septiembre, 1996.
9. BOLTON, J.F.; CROZIER, L.; WILLIANSON, J.K. Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.317-321, 1996.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura. Divisão de Produtos de Origem animal – DIPOA. **Portaria nº352 de 04 de setembro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial . Brasília. DF. 08 de set. 1997.

11. BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Alimentos - DINAL. **Portaria nº451 de 19 de setembro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial. Brasília. DF.22 de set. 1997.
12. CARMO, L.S., DIAS, R.S., LINARDI, V.R., SENA, M.J., SANTOS, D.A., FARIA, M.E., PENA, E.C. Intoxicação alimentar causada por linhagens enterotoxigências de *Staphylococcus aureus* veiculadas por queijo tipo "Minas". In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20**, Salvador. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p.347.
13. 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, Sept., 1995.
14. COHEN, A.E.; KERDAHI, K.F. Evaluation of a rapid and automated enzyme-linked fluorescent immunoassay for detection of *Escherichia coli* serogroup O157 in cheese. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.79, n.4, Jul-Aug, p.858-860, 1996.
15. CONNER, D.E.; HALL, G.S. Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. **Food Microbiology**, London, v.11, p.337-344, 1994.
16. CRAY, W.C.; CASEY, T.A.; BOSWORTH, B.T.; RASMUSSEN, M.A. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p.1975-1979, May, 1998.
17. CUNHA, C.P.; NASCIMENTO, M.G.F.; JESUS, V.L.T.; NASCIMENTO, E.R.; CORBIA, A.C.G. Queijo tipo Minas frescal com e sem serviço de inspeção federal - contaminação por coliformes fecais e *Escherichia coli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 5, Foz do Iguaçu. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Médicos Veterinários, 1999. 34-35.
18. DAVIS, M.; OPSAKI, C.; GORDON, D.; MOTTRAM, K.; WINEGAR, C.; JARDINE, D.; GOLDOFT, M.; BARTLESON, B.; LEWIS, J. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - Western United States, 1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.42, n.14, p.258-263, Apr., 1993.

19. DIEZ-GONZALEZ, F.; CALLAWAY, T.R.; KIZOULIS, M.J.; RUSSELL, J.B. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. **Science**, v.281, p.1666-68, 1998.
20. DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n.12, p.289-302, Dec., 1991.
21. 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, Oct., 1987.
22. ERICKSON, J.P.; STAMER, J.W.; HAYES, M.; MCKENNA, D.N.; ALSTINE, L.A.V. An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.10, p.1059-1064, Oct., 1995.
23. FLINT, S.H.; HARTLEY, N.J. Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 visual immuassay for testes on dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, p.79-82, 1995
24. FONSECA, L.M. Alguns parâmetros físico-químicos de queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: Instituto Cândido Tostes, 1995, p.95-97.
25. GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFAMNN, F.L.; VINTURIM, T.M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.54, n.2, p.78-82, 1994.
26. GÓMEZ, R.C.; CARVALHO, E.P.; COSTA, L.C.G. Condições microbiológicas de queijo Minas-frescal comercializados em Lavras-MG. **Ciências Práticas de Lavras**, Lavras, v.7, n.2, p.111-121, jul./dez., 1983.
27. HALDANE, D.J.M.; DAMM, M.A.S.; ANDERSON, J.D. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for Vero (shiga-like)-toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.24, n.4, p.652-653, Oct., 1986.

28. HANCOCK, D.D., RICE, D.H., HERRIOT, D.E., BESSER, T.E., EBEL, E.D., CARPENTER, L.V. Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.4, p.363-366, Apr., 1997.
29. HARMON, B.G., BROWN, C.A., TKALCIC, S., MUELLER, P.O.E., PARKS, A., JAIN, A.V., ZHAO, T., DOYLE, M.P. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, n.6, p.574-579, June, 1999.
30. HOVDE, C.J., AUSTIN, P.R., CLOUD, K.A., WILLIAMS, C.J., HUNT, C.W. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.7, July, p.3233-3235, 1999.
31. HUDSON, L.M.; CHEN, J.; HILL, A.R.; GRIFFITHS, M.W. Bioluminescence: a rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and cheese varieties. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.8, p.891-897, Aug., 1997.
32. ITOH, Y., SUGITA-KONISHI, Y., KASUGA, F., IWAKI, M., HARA-KUDO, Y., SAITO, N., NOGUCHI, Y., KONUMA, H., KUMAGAI, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.4, p.1532-1535, Apr., 1998.
33. JOHNSON, J.L.; ROSE, B.E.; SHARAR, A.K.; RANSOM, G.M.; LATTUADA, C.P.; McNAMARA, A.M. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.6, June, 1995.
34. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of microorganisms**, 8.ed., Prentice-Hall - Inc., New Jersey (USA), 1997.
35. MARCH, S.B.; RATNAM, S. Sorbitol MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, p.869-872, 1986.
36. MARINUZZI, H.C.; VANETTI, M.C.D.; FERNANDES, T.M. Avaliação da incidência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal produzido na região de Viçosa - MG. In: RESUMOS DO VI ENAAL - ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, Curitiba, outubro, 1990, p.81.
37. MEAD, P.S., GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, London, v.352, n.10, Oct., p.1207-1212, 1998.

38. MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.5, p.179-184, June, 1994.
39. MOLEND, J.R. *Escherichia coli* (including O157:H7): An environmental health perspective. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.14, n.12, p.742-747, Dec., 1994.
40. MORGAN, D.; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yogurt. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.111, n.2, p.181-187, Oct., 1993.
41. NASCIMENTO, D.; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas-frescal da cidade de Ouro Preto (MG). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia - SBCTA**, Campinas, v.19, n.2, p.121-129, abr./jun., 1985.
42. OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E. Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat. **Revisions Laboratory Communication n°38, USDA, FSIS, Microbiology Division**, 1989. Apud: *Journal of Food Protection*, Ames, v.58, n.6, p.597-598, June, 1995.
43. OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; BENNETT, B. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.3, p.249-252, Mar., 1990 a.
44. OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; LATTUADA, C.P. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.941-943, Nov., 1990 c.
45. OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; MATNER, R. An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilm test kit-HEC-for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.936-940, Nov., 1990 b.
46. ORMENESE, R.C.S.C., SILVEIRA, N.F.A., SILVA, N. *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia - SBCTA**, Campinas, v.33, n.1, p.41-49, jan/jun, 1999.
47. 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, July, 1992.

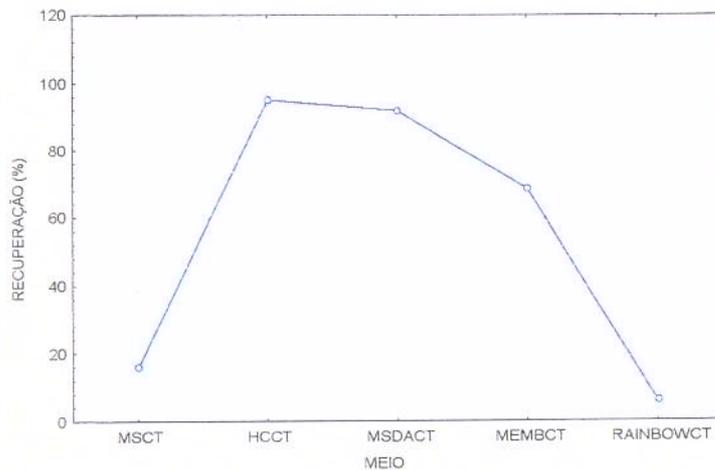
48. PELL, A.N. Manure and microbes: public and animal health problem? **Journal of Dairy Science**, v.80, n.1, p.02673-2681, 1997.
49. PEREIRA, M.L., AMÂNCIO, G.C.S., BABÉTO, M.L., REZENDE, P.R., LEOCÁDIO FILHO, G., HOFER, E. Queijo tipo Minas estocado a baixas temperaturas. VII - recuperação de *Escherichia coli* e pesquisa de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p. 349.
50. PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C.; HOFER, E. Queijo tipo "Minas".II - contaminação por coliformes fecais e *Salmonella* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p. 278.
51. PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n.4, p.349-350, 1991.
52. PINTO, C.L.O.; SOUZA, A.L.; FANTUZZI, E.; FROEHLICH, A.; VANETTI, M.C.D. Coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo Minas comercializados no município de Viçosa, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p. 288.
53. RAIMUNDO, S.M.C.; FAVARIN, V.; ROBBS, P.G.; SILVA, P.P.O.; HAVA, M.J. Qualidade microbiológica de queijo Minas frescal no comércio do Rio de Janeiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.47, n.279/281, p.169-173, 1992.
54. REITSMA, C.J.; HENNING, D.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.5, p.460-464, May, 1996.
55. RICE, E. Drinking water associated with waterborne disease: hemorrhagic colitis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, p.603, 1993.
56. RILEY, L.W. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. **Annual Review Microbiology**, California, v.41, p.387-407, 1987.

57. RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSIN, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.L.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.308, n.12, p.681-685, mar., 1983.
58. RYAN, C.A.; TAUXE, R.V.; HOSEK, G.W.; WELLS, J.G.; STOEZ, P.A.; McFADDEN, H.W.; SMITH, P.W.; WRIGHT, G.F.; BLAKE, P.A. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.154, n.4, p.631-638, Oct., 1986.
59. SÁ BARRETO, E.S.; PEREIRA, C.R.P. Avaliação da qualidade das marcas de queijo Minas tipo frescal consumidas no município do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 5, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu, 1999, p. 53.
60. SAAD, S.M.I., VANZIN, C., FRANCO, B.D.G.M., OLIVEIRA, M.N. Comportamento de *Escherichia coli* O157:H7 em queijo Minas frescal fabricado em diferentes condições de processamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p. 379.
61. SAAD, S.M.I., VANZIN, C., FRANCO, B.D.G.M., OLIVEIRA, M.N. Petrifilm kit-HEC: método sensível para a contagem de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de queijo Minas frescal e soro de leite experimentalmente contaminados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p.391.
62. SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.5, p.458-461, 1988.
63. SHERIDAN, J.J.; McDOWELL, D.A. Factors affecting the emergence of pathogens on foods. **Meat Science**, Barking, v.49, n.1., p.151-157, 1998.
64. SILVA, C.A.M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo Minas frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: PROGRAMA OFICIAL E RESUMOS. IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Rio de Janeiro, outubro, 1980, p. 202.

65. SIVELÄ, S. *Escherichia coli* O157:H7 an emerging pathogen? **Bulletin of the International Dairy Federation – IDF**, Brussels, n. 302, p.54-56, 1995.
66. SOUSA, C.L., MORGADO, F.A.F., VACONCELOS, N.C.V., COSTA, C.M.R. Presença de coliformes em leite e derivados comercializados na cidade de Belém - Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p.346.
67. STAVRIC, S.; SPEIRS, J.I. *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v.22, n.3, p.205-208, 1989.
68. STEPHENS, P.J., JOYNSON, J.A. Direct inoculation into media containing bile salts and antibiotics is unsuitable for the detection of acid/salt stressed *Escherichia coli* O157:H7 O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 27, p.147-151, 1998.
69. SWINBANKS, D. Outbreak of *E. coli* infection in Japan renews concerns. **Nature**, London, v.382, n.6589, July, 1996.
70. SZABO, R.A.; TODD, E.C.D.; JEAN, A. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. **Journal of Food Protection**, Ames, v.49, n.10, p.768-772, Oct., 1986.
71. UPTON, P.; COIA, J.E. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurised milk supply. **The Lancet**, London, v.344, Oct, 1994.
72. VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3.ed., Washington: American Public Health Association - APHA, 1992, 1219 p.
73. VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY, C., RAY-GUENIOT, S., BOUTRAND-LOEÏ, S., MEYRAND, A., RICHARD, Y. Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS™ E. coli O157. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.25, p.442-446, 1997.

74. WANG, G., ZHAO, T., DOYLE, M.P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.6, p.610-613, June, 1997.
75. 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, p.7-12, 1995.
76. WELLS, J.G.; SHIPMAN, L.D.; GREENE, K.D.; SOWERS, E.G.; GREEN, J.H.; CAMERON, D.N.; DOWNES, F.P.; MARTIN, M.L.; GRIFFIN, P.M.; OSTROFF, S.M.; POTTER, M.E.; TAUXE, R.V.; WACHSMUTH, I.K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.5, p.985-989, May, 1991.
77. ZADIK, P.M.; CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C.A. Use of tellurite for selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, v.39, p.155-158, 1993.

## ANEXOS



**Figura 1.** Comparação entre os meios para contagem direta de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo Minas frescal pasteurizado

**Tabela 1.** Valores médios e desvio padrão da porcentagem de recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de queijo pasteurizado nos meios MSCT, HCCT, MSDACT, MEMBCT e RAINBOW+nCT

MEIOS	Médias da porcentagem de recuperação	Desvio padrão
MSCT	15,73	3,16
HCCT	95,07	4,53
MSDACT	91,80	7,87
MEMBCT	68,57	4,11
RAINBOW+nCT	5,90	0,69

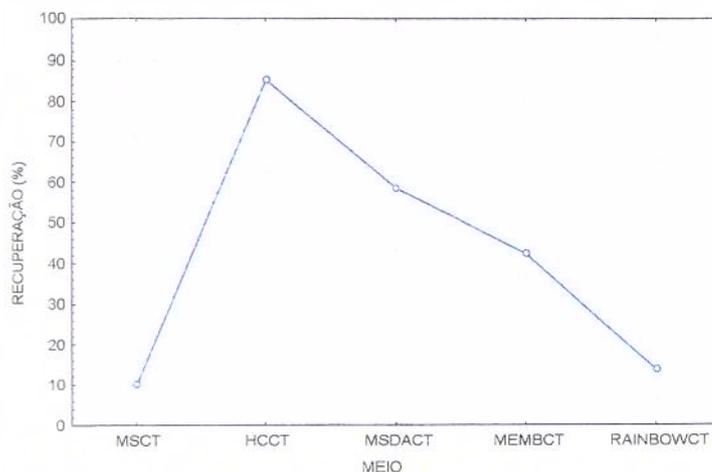
MSCT: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)

HCCT: ágar HC suplementado com com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)

MSDACT: ágar SD-39 modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)

MEMBCT: ágar EMB modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)

RAINBOW+nCT: ágar RAINBOW O157 suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)

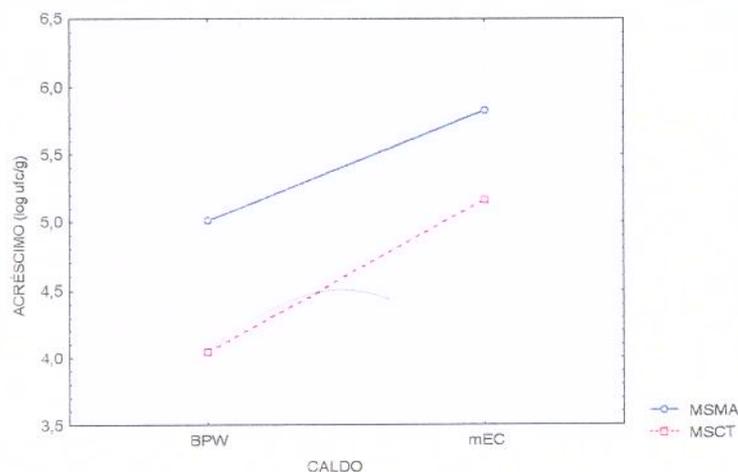


**Figura 2.** Comparação entre os meios para contagem direta de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite pasteurizado

**Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão da porcentagem de recuperação de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de leite pasteurizado nos meios MSCT, HCCT, MSDACT, MEMBCT e RAINBOW+nCT

MEIOS	Médias da porcentagem de recuperação	Desvio padrão
MSCT	10,00	5,86
HCCT	85,30	5,37
MSDACT	58,40	28,48
MEMBCT	42,27	3,91
RAINBOW+nCT	13,77	0,76

MSCT: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)  
 HCCT: ágar HC suplementado com com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)  
 MSDACT: ágar SD-39 modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)  
 MEMBCT: ágar EMB modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)  
 RAINBOW+nCT: ágar RAINBOW O157 suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)



**Figura 3.** Comparação entre as médias de acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo pasteurizado, submetidas a enriquecimento nos caldos BPW+3 antibióticos e mEC e semeadura posterior nos ágar MSMA e MSCT

**Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão do acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de queijo pasteurizado, submetidas a enriquecimento em BPW + 3 antibióticos e mEC e semeadura em ágar MSMA e MSCT

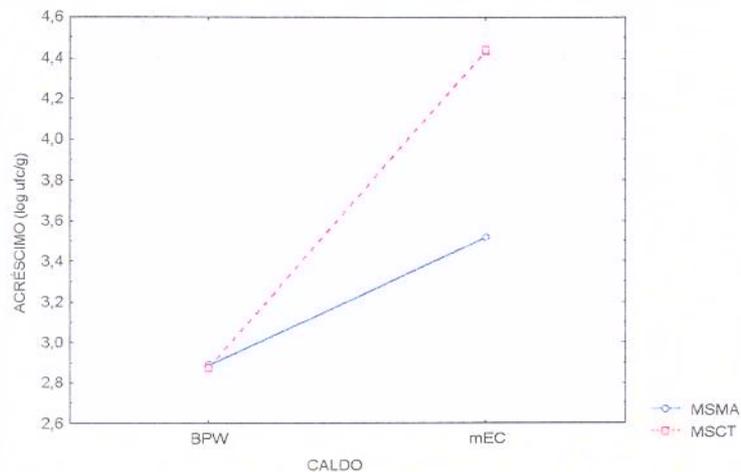
CALDO	MEIO	Média do acréscimo (log ufc/g)	Desvio padrão
BPW	MSMA	5,01	0,94
BPW	MSCT	4,04	0,44
mEC	MSMA	5,83	0,20
mEC	MSCT	5,17	0,46

BPW + 3 antibióticos: água peptonada tamponada adicionada de cefixima (0,05mg/L), cefsulodina (10mg/L) e vancomicina (8mg/L)

mEC: caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)



**Figura 4.** Comparação entre as médias de acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo não pasteurizado, submetidas a enriquecimento nos caldos BPW+3 antibióticos e mEC e semeadura posterior nos ágar MSMA e MSCT

**Tabela 4.** Valores médios e desvio padrão do acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de queijo não pasteurizado, submetidas a enriquecimento em BPW + 3 antibióticos e mEC e semeadura em ágar MSMA e MSCT

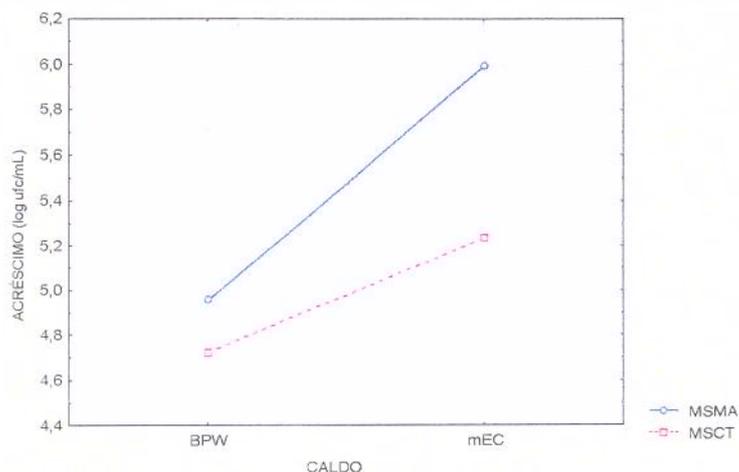
CALDO	MEIO	Média do acréscimo (log ufc/g)	Desvio padrão
BPW	MSMA	2,89	2,54
BPW	MSCT	2,87	2,52
mEC	MSMA	3,52	3,07
mEC	MSCT	4,44	1,00

BPW + 3 antibióticos: água peptonada tamponada adicionada de cefixima (0,05mg/L), cefsulodina (10mg/L) e vancomicina (8mg/L)

mEC: caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)



**Figura 5.** Comparação entre as médias de acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite pasteurizado, submetidas a enriquecimento nos caldos BPW+3 antibióticos e mEC e semeadura posterior nos ágar MSMA e MSCT

**Tabela 5.** Valores médios e desvio padrão do acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de leite pasteurizado, submetidas a enriquecimento em BPW + 3 antibióticos e mEC e semeadura em ágar MSMA e MSCT

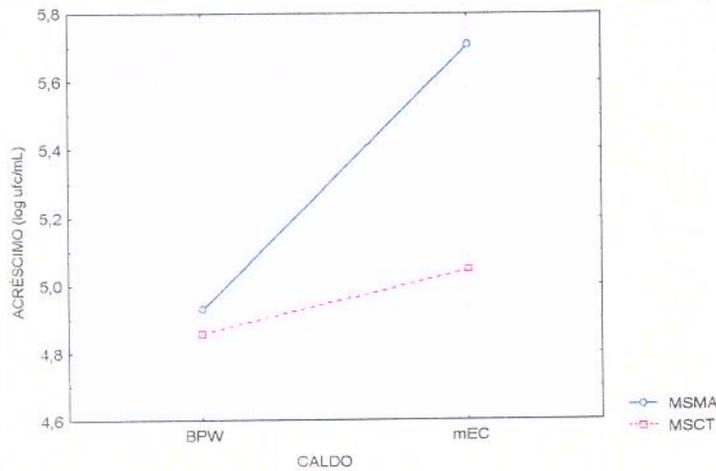
CALDO	MEIO	Média do acréscimo	Desvio padrão
BPW	MSMA	4,96	0,24
BPW	MSCT	4,72	0,44
mEC	MSMA	6,00	0,28
mEC	MSCT	5,24	1,20

BPW + 3 antibióticos: água peptonada tamponada adicionada de cefixima (0,05mg/L), cefsulodina (10mg/L) e vancomicina (8mg/L)

mEC: caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)



**Figura 6.** Comparação entre as médias de acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru, submetidas a enriquecimento nos caldos BPW+3 antibióticos e mEC e semeadura posterior nos ágar MSMA e MSCT

**Tabela 6.** Valores médios e desvio padrão do acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de leite cru, submetidas a enriquecimento em BPW + 3 antibióticos e mEC e semeadura em ágar MSMA e MSCT

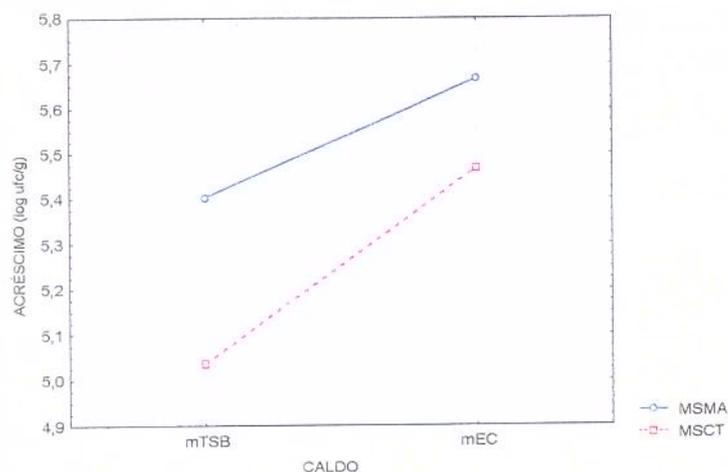
CALDO	MEIO	Média do acréscimo	Desvio padrão
BPW	MSMA	4,93	0,24
BPW	MSCT	4,86	0,32
mEC	MSMA	5,71	0,49
mEC	MSCT	5,05	1,24

BPW + 3 antibióticos: água peptonada tamponada adicionada de cefixima (0,05mg/L), cefsulodina (10mg/L) e vancomicina (8mg/L)

mEC: caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)



**Figura 7.** Comparação entre as médias de acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de queijo pasteurizado, submetidas a enriquecimento nos caldos mTSB e mEC e semeadura posterior nos ágar MSMA e MSCT

**Tabela 7.** Valores médios e desvio padrão do acréscimo da população de *E. coli* O157:H7 inoculada em amostras de queijo pasteurizado, submetidas a enriquecimento em mTSB e mEC e semeadura em ágar MSMA e MSCT

CALDO	MEIO	Média do acréscimo	Desvio padrão
mTSB	MSMA	5,40	0,22
mTSB	MSCT	5,04	0,21
mEC	MSMA	5,64	0,20
mEC	MSCT	5,47	0,26

mTSB: caldo triptona e soja modificado suplementado com casaminoácidos e acriflavina (10mg/L)

mEC: caldo EC modificado com 20 mg/L de novobiocina

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado

MSMA: ágar MacConkey sorbitol modificado suplementado com cefixima (0,05mg/L) e telurito (2,5mg/L)