

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA: DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

PAULA APARECIDA MARTINS BORGES BASTOS

SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTES

BOM JESUS DO ITABAPOANA – RJ
2009

PAULA APARECIDA MARTINS BORGES BASTOS

SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ

Co-Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

**Niterói – RJ
2009**

PAULA APARECIDA MARTINS BORGES BASTOS

SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em ____ dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez – Orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Co-orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Sérgio Borges Mano
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Jorge Ubirajara Dias Boechat
Instituto Federal Fluminense

Prof. Dr. Fábio da Costa Henry
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Niterói - RJ
2009

Aos meus pais, Leny Borges Bastos e Luciano Augusto Bastos, a quem devo tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez, meu orientador, por ter sempre acreditado em mim e incentivado meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco, meu co-orientador, pelas valiosas e indispensáveis orientações, sem as quais, com certeza esse trabalho não teria se desenvolvido.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal na Universidade Federal Fluminense que se dispuseram a ministrar suas disciplinas e orientações em Bom Jesus do Itabapoana, na turma de Bom Jesus, da qual faço parte.

Ao Diretor do CTAIBB, Fernando Antonio Abrantes Ferrara, que não mediu esforços para que nossa turma de Pós-Graduação de Bom Jesus alcançasse êxito em seus trabalhos.

Aos meus companheiros da turma de Pós-Graduação de Bom Jesus, sempre presentes e otimistas durante toda nossa jornada.

Ao meu colega de trabalho, Wagner Ferreira de Oliveira, que muito me auxiliou no desenvolver da pesquisa.

Aos meus estagiários e bolsistas Jovens Talentos, Diogo, Dhiego, Laysa, Hebert, Helver e Marcela, fonte de estímulo para o constante aprendizado.

Ao meu companheiro, Alexander Safonoff Diniz, por sua paciência e compreensão.

À minha irmã, Claudia Borges Bastos do Carmo, por tudo.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.7

LISTA DE ABREVIATURAS, p.8

RESUMO, p.9

ABSTRACT, p.10

1 INTRODUÇÃO, p.11

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.14

2.1 *Escherichia coli*, p.14

2.1.1 Características gerais, p.14

2.1.2 *E. coli* patogênicas, p.15

2.1.2.1 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), p.16

2.1.2.2 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), p.16

2.1.2.3 *E. coli* enteroagregativa (EAEC), p.17.

2.1.2.4 *E. coli* de aderência difusa (DAEC), p.17

2.1.2.5 *E. coli* enteropatogênica (EPEC), p.18

2.1.2.6 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), p.18

2.1.3 EHEC, VTEC (ou STEC) e *E. coli* O157:H7, p.20

2.1.4 *E. coli* O157:H7, p.21

2.1.4.1 Características gerais, p.21

2.1.4.2 Resistência ao ácido, p.21

2.1.4.3 Principais quadros clínicos, p.22

2.1.4.4 Formas de transmissão, p.23

2.1.4.5 Alimentos relacionados com surtos, p.24

2.1.4.6 Dose infectante, p.25

- 2.1.5 *E. coli* O157:H7 no Brasil, p.25
 - 2.1.5.1 Distribuição nos rebanhos e ambiente, p. 25
 - 2.1.5.2 Detecção de *E. coli* O157:H7 nos alimentos, p.27
 - 2.1.5.3 Casos clínicos de EHEC, p.28
- 2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS, p.29
 - 2.2.1 Conceitos e características gerais de fermentação, p.29
 - 2.2.2 Leites fermentados, p.30
 - 2.2.3 Bactérias Ácido Láticas, p.32
 - 2.2.3.1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, p.33
 - 2.2.3.2 *Streptococcus thermophilus*, p.34
 - 2.2.3.3 Ação inibidora das BAL e *E. coli*, p.36
- 2.3 IOGURTE, p.40
 - 2.3.1 Conceito e características gerais, p.40
 - 2.3.2 Aspectos bacteriológicos: culturas iniciadoras, p.42
 - 2.3.3 Aspectos físico-químicos: pH e acidez titulável, p.43
- 2.4 SEGURANÇA DOS ALIMENTOS FERMENTADOS, p.45

3 DESENVOLVIMENTO, p.47

- 3.1 SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTE INTEGRAL E DESNATADO CONTAMINADOS LABORATORIALMENTE PÓS-FERMENTAÇÃO, p.47
- 3.2 SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTE COM DIFERENTES TEORES DE AÇÚCAR, p.61

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p.75

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1 Esquema de uma linha aberta de processamento de iogurte, p.42
- Figura 1 Representação gráfica dos resultados das contagens de *Streptococcus thermophilus* em iogurtes estocados a 4°C: integral contaminado com *E. coli* O157:H7; desnatado contaminado com *E. coli* O157:H7; integral não contaminado; desnatado não contaminado, p.52
- Figura 2 Representação gráfica dos resultados das contagens de *Lactobacillus bulgaricus* em iogurtes estocados a 4°C: integral contaminado com *E. coli* O157:H7; desnatado contaminado com *E. coli* O157:H7; integral não contaminado; desnatado não contaminado, p.53
- Figura 3 Representação gráfica dos resultados das contagens de *Escherichia coli* O157:H7 em iogurte integral e desnatado estocados a 4°C, p.54
- Figura 4 Representação gráfica dos resultados das contagens de *E. coli* O157:H7 EDL 933 em iogurte sem adição de sacarose, com 10 % de sacarose e com 15% de sacarose estocados a 4,0°C ± 2,0°C, p.69

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aderência Agregativa
AE	“Attaching and Effacing”
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de Aderência Difusa “Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i> ”
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEK	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa “Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> ”
EC	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica “Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> ”
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva “Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> ”
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica “Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ”
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica “Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FAO	“Food and Agriculture Organization”
HeLa	Senhorita Henrietta Lagks – doadora involuntária de uma cultura de células cancerosas (câncer de colo de útero)
HEp-2	Linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano
HUS	Síndrome Urêmica Hemolítica “Hemolytic Uremic Syndrome”
LEE	“Locus Enterocyte Effacement”
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Termolábil
NM	Não móvel “Not Motile”
ST	Termoestável
TTP	Trombose Púrpura Trombocitopênica “Thrombotic Thrombocytopenic Purpura”
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigênica “Verotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ”
STEC	<i>Escherichia coli</i> Shiga-toxina “Shiga-like Toxina <i>Escherichia coli</i> ”
WHO	Organização Mundial de Saúde “World Health Organization”

RESUMO

Escherichia coli O157:H7 é um patógeno emergente que vem ocasionando vários surtos de origem alimentar nas últimas décadas. As várias complicações decorrentes de enfermidades causadas por esse agente etiológico podem levar a problemas renais graves e até mesmo à morte, principalmente em grupos etários mais sensíveis como crianças e idosos. A relativa resistência do microrganismo às condições ácidas facilita sua permanência em alimentos muitas vezes considerados seguros, como é o caso dos alimentos fermentados. O iogurte é um tipo de leite fermentado, tendo sido relatado um caso de surto provocado por *E. coli* O157:H7 em iogurte contaminado, envolvendo principalmente crianças. O presente trabalho teve como objetivo aportar ferramentas para a avaliação do risco microbiológico “microbiological risk assessment” de iogurtes, buscando ainda detectar se diferenças na composição desses alimentos podem conduzir a diferentes riscos microbiológicos no que se refere à presença de *E. coli* O157:H7. O primeiro capítulo refere-se ao estudo da viabilidade de *E. coli* O157:H7 (CDC EDL-933) inoculada pós-fermentação em amostras de iogurte integral e desnatado. A concentração inicial de *E. coli* foi da ordem de $\log 4,36$ UFC/mL e sua presença foi detectada até o quarto dia de produção em ambos os tipos de iogurte. Não foi observada diferença significativa no efeito dos diferentes teores de gordura dos iogurtes estudados sobre a permanência do patógeno no alimento. O segundo capítulo refere-se ao estudo da viabilidade de *E. coli* O157:H7 (CDC EDL-933) inoculada pós-fermentação em amostras de iogurte com diferentes teores de açúcar. A concentração inicial de *E. coli* foi da ordem de $\log 4,1$ UFC/mL. A bactéria foi detectável até o quinto dia de estocagem em iogurte sem adição de sacarose, sendo que em iogurtes contendo 10 e 15% do açúcar, observou-se a presença do microrganismo até o sétimo e oitavo dias, respectivamente. Com base nesses achados conclui-se que maiores concentrações de açúcar podem proteger a *E. coli* O157:H7 da ação inibidora da microbiota própria desse produto lácteo.

Palavras-chave: *Escherichia coli* O157:H7; leites fermentados; bactérias ácido lácticas; iogurte; gordura; açúcar; sacarose.

ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 is an emergent pathogen that has caused several outbreaks of foodborne diseases in recent decades. Severe kidney problems and even death are some of the complications of diseases caused by this agent, especially in sensitive group like children and elderly. The resistance of this microorganism to acid conditions facilitates its maintenance in foods often considered safe like fermented foods. Yoghurt is a type of fermented milk and exist a record of outbreak caused by *E. coli* O157:H7 in contaminated yoghurt, mainly involving children. The aim of this work was to give some tools for microbiological risk assessment of yoghurt, seeking to detect if differences in the composition of yoghurt can lead to different microbiological hazards in relation to the presence of the pathogen *E. coli* O157:H7. The first chapter refers to the viability of *E. coli* O157:H7 (CDC EDL-933) inoculated post-fermentation in samples of yoghurt made with whole and skim milk. The initial concentration of *E. coli* was about 4.36 log CFU/mL and its presence was detected until the fourth day of production in both types of yoghurt. There was no significant difference in the effect of different fat content of yoghurts studied on the permanence of the pathogen in food. The second chapter refers to the viability of *E. coli* O157:H7 (CDC EDL-933) inoculated post-fermentation in yoghurt samples with different sugar contents. The initial concentration of *E. coli* was about 4.1 log CFU/mL. The pathogen was detected until the fifth day of storage in yoghurt with no added sucrose and in yoghurt with 10 and 15% of sugar, their presence was observed until the seventh and eighth days, respectively. These findings show that higher concentrations of sugar may have a protective function on *E. coli* O157:H7 in yoghurt.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7; fermented milk; lactic acid bacteria; yoghurt; fat; sugar; sucrose

1 INTRODUÇÃO

O iogurte é um tipo de leite fermentado bastante difundido e apreciado mundialmente. Com a preocupação cada vez maior, por parte dos consumidores, em ingerir alimentos naturais e saudáveis, a indústria tem se voltado para o desenvolvimento de iogurtes com baixos teores de gordura, existindo uma grande variedade e um volume cada vez maior de iogurtes “light” no mercado. Há que se ressaltar ainda as exigências de consumo diferenciadas quanto aos teores de açúcar de acordo com características regionais, fazendo com que muitas vezes diferentes tipos de iogurte sejam produzidos de acordo com a preferência local.

No Brasil, o número de laticínios que produz iogurte tem crescido consideravelmente nos últimos anos devido, entre outros fatores, à estabilidade econômica e ao aumento da demanda dos consumidores. Dados da Associação Brasileira da Indústria de Iogurtes, no ano de 2000, estimam uma produção superior

a 500 mil toneladas/ano, sendo que desse montante 20% seria produzido por micro-fabricantes regionais.

Pequenos laticínios em geral utilizam o sistema aberto de produção, com o leite sendo processado em equipamentos abertos, com grande manipulação humana, o que aumenta os riscos de contaminação pós-pasteurização por *Escherichia coli*.

E. coli é uma bactéria potencialmente patogênica, sendo de ocorrência constante em leite e derivados lácteos quando os procedimentos de sanidade animal, de ordenha higiênica e de tratamento térmico não são efetuados criteriosamente. A pasteurização é eficiente em sua eliminação, porém a contaminação pós-pasteurização pode comprometer a qualidade bacteriológica do alimento produzido, tornando-o impróprio para o consumo humano devido aos riscos de conter agentes etiológicos de doenças alimentares.

A Avaliação do Risco Microbiológico é um instrumento de avaliação utilizado pelos órgãos governamentais para o controle de alimentos. A Avaliação do Risco Microbiológico de um alimento tem por base estimar qual a probabilidade deste alimento causar doenças, que população será atingida e quais serão os efeitos dessas doenças. Para conseguir responder a essas questões, é necessário que se estabeleça que microrganismo pode ser encontrado no produto “Hazard Identification”, a quantidade de patógeno que será ingerida em função do consumo do alimento “Exposure Assessment”, qual será o efeito no ser humano “Hazard Characterisation” e qual o risco geral para uma determinada população “Risk Characterisation”. Com todos esses conhecimentos é possível estabelecer o grau de risco de um determinado alimento em causar uma determinada doença de origem alimentar.

Para que se possa caracterizar o real perigo existente nos iogurtes com relação à *E. coli* O157:H7 é importante estabelecer se diferentes tipos de iogurte possuem características distintas que preconizam ações de prevenção contra agentes etiológicos de doenças alimentares diferenciadas em relação a cada produto. A possível diferença de comportamento da microbiota ácido láctica em função da variação na composição da matéria-prima tem sido apontada por inúmeros pesquisadores, contudo não há dados concretos de que essas alterações comportamentais possam ocorrer entre amostras de iogurtes naturais do tipo integral ou desnatado, com ou isento de açúcar. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em iogurtes contendo diferentes teores de gordura e sacarose.

Este trabalho consta inicialmente de uma revisão de literatura sobre o tema abordado. No desenvolvimento, os capítulos referem-se aos artigos científicos originados a partir das pesquisas realizadas. Vale destacar que todo o experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do atual Campus Bom Jesus / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense (IFF), antigo Colégio Técnico Agrícola Ildfonso Bastos Borges (CTAIBB) / Universidade Federal Fluminense (UFF), utilizando a matéria-prima a partir do rebanho próprio, livre de antimicrobianos. Os artigos foram remetidos para publicação e se encontram nessa tese traduzidos do inglês. As referências bibliográficas dos artigos seguem as exigências dos periódicos aos quais foram submetidos. Finalizando, são apresentadas as considerações finais e a bibliografia geral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Características gerais

Escherichia coli, como todo membro da família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa e oxidase negativa. Segundo Krieg e Holt (1984), a *E. coli* fermenta glicose através de fermentação ácido mista, produzindo ácido láctico, acético e fórmico. A grande maioria das estirpes possui a capacidade de produzir gás a partir da hidrólise do ácido fórmico, sendo capaz de utilizar várias fontes de carbono, como o acetato, glicose e lactose, porém não o citrato. Produz indol, porém não hidrolisa a uréia nem produz sulfeto de hidrogênio. A enzima β -glicuronidase é produzida por 96% das cepas de *E. coli*, enquanto segundo Karmali (1989), a fermentação de sorbitol em 24 h é realizada por 95% das cepas de *E. coli*.

2.1.2 *E. coli* patogênicas

Apesar de *E. coli* ser uma espécie bacteriana da microbiota saprofítica do trato intestinal de humanos e de uma grande variedade de animais, determinados patótipos podem causar graves problemas gastrointestinais, com diarreias severas e suas complicações (MENG et al., 2001). Greig e Ravel (2009) analisaram 4.093 surtos de infecção de origem alimentar entre os anos de 1995 e 2005 e encontraram *E. coli* sendo incriminada em 9,5% dos casos, sendo a terceira maior causa de infecção, perdendo apenas para *Salmonella* spp e Norovírus.

A classificação de *E. coli* baseia-se em diferenças antigênicas (sorotipagem) e fatores de virulência. O antígeno O (do lipopolissacarídeo LPS) caracteriza o sorogrupo da cepa e o flagelo H caracteriza o sorotipo. Cepas sem flagelo são identificadas como NM “nom motile”. Algumas cepas possuem um antígeno capsular K que também é utilizado para classificação. Existem mais de 170 diferentes sorogrupos identificados de *E. coli*, e há uma certa correlação entre sorogrupo e virulência. A classificação através do sistema de virulência é baseada em características como: forma de adesão da bactéria às células do hospedeiro, efeitos da adesão às células do hospedeiro, produção de toxinas e grau de invasão (MENG et al., 2001). Segundo Torres et al. (2005), os fatores de adesão das cepas patogênicas de *E. coli* são estruturas protéicas associadas à superfície da membrana bacteriana e podem ser divididos em adesinas fimbriais e não fimbriais.

Meng et al. (2001) alertam que a classificação dos grupos de *E. coli* leva em consideração os dois sistemas (sorogrupo e virulência), porém nem sempre há como categorizar uma cepa apenas baseado nessas diferenças, pois a capacidade patogênica da bactéria pode ser transmitida geneticamente entre as cepas através

de plasmídeos, fagos e ilhas cromossômicas de patogenicidade. Clarke et al. (2003), Kehl (2002), Mellies et al. (2007), Meng et al. (2001), Servin (2005) e Torres et al. (2005), categorizam a *E. coli* em seis principais patotipos causadores de diarreia em humanos: enterotoxigênica, enteroinvasiva, enteroagregativa, de aderência difusa, enteropatogênica e enterohemorrágica, as quais estão sumariamente apresentadas a seguir.

2.1.2.1 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

As cepas ETEC aderem à mucosa do intestino delgado proximal através do fator de adesão de adesinas fimbriais. Os sintomas são decorrentes da ação de duas enterotoxinas, uma termolábil (LT) e outra termoestável (ST), que agem sobre as células da mucosa intestinal causando diarreia aquosa abundante. As cepas ETEC são a maior causa da conhecida “diarreia dos viajantes” nos países industrializados e de uma severa diarreia (que chega a ser fatal) em crianças de países em desenvolvimento. As principais fontes de infecção são alimentos e água contaminados.

2.1.2.2 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

As cepas EIEC são bioquímica, genética e patogenicamente semelhantes à *Shigella* spp., porém não produzem Shiga toxina. Provocam principalmente diarreia aquosa e disenteria. Os sintomas podem ser semelhantes à diarreia secretora associada com cepas ETEC. Os surtos normalmente estão associados com

alimentos e água contaminados, mas a infecção pode ser transmitida também através de pessoa-pessoa.

2.1.2.3 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

As cepas desse grupo não secretam enterotoxinas LT e ST, porém produzem outras toxinas termoestáveis que causam danos à mucosa. A forma de adesão às células epiteliais é do tipo Aderência Agregativa (AA). Os sintomas são vômito e diarreia. Os surtos detectados foram associados com consumo de alimentos em restaurantes. A bactéria está associada tanto a diarreia aguda quanto crônica em várias partes do mundo, inclusive em países em desenvolvimento. A patogênese ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que EAEC adere à superfície mucosa do intestino delgado e grosso estimulando a produção de muco.

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

As cepas DAEC formam um grupo heterogêneo em que a principal característica é a aderência difusa às células HEp-2 ou HeLa. Além de causar várias infecções entéricas, como diarreia em crianças, também estão relacionadas com infecções no trato urinário (pielonefrite, cistite e bacteriúria assintomática). Sua patogênese ainda é pouco conhecida, e não há descrição de surtos relacionados com alimentos até o momento.

2.1.2.5 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

As estirpes EPEC não produzem toxina, porém aderem à mucosa intestinal do intestino delgado e causam extenso rearranjo das actinas das células do hospedeiro. Provocam uma profusa diarreia aquosa principalmente em crianças com menos de dois anos de idade, sendo considerado um importante agente etiológico de diarreia infantil em países em desenvolvimento. A transmissão ocorre através da via fecal-oral, podendo ter como veículo mãos, alimentos ou fórmulas infantis contaminados. Estima-se que a dose infectante para adultos esteja entre 10^8 e 10^{10} bactérias.

2.1.2.6 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

E. coli enterohemorrágica e EPEC se distinguem de outras cepas de *E. coli* patogênicas por possuírem uma ilha cromossômica de patogenicidade conhecida como *Locus of Enterocyte Effacement (LEE)*. *LEE* codifica o sistema de secreção tipo III e todas as proteínas associadas com a formação de lesões histopatológicas nas células epiteliais do intestino conhecidas como *Attaching and Effacing (A/E)*. Essas lesões epiteliais são marcadas por degeneração na superfície das bordas, perda das microvilosidades, e reunião altamente organizada de actina formando agrupamento de células individuais tipo “pedestal”. A ilha de patogenicidade *LEE* é essencial para o desenvolvimento de doenças tanto em EPEC quanto em EHEC.

Embora EHEC e EPEC sejam geneticamente relacionadas, muitos aspectos de sua epidemiologia, patogênese e nicho que ocupam no hospedeiro humano são

únicos. Uma das principais características de EHEC é a produção de uma ou duas toxinas conhecidas como Shiga-toxina (*stx1* e *stx2*), por sua semelhança à toxina da *Shigella dysenteriae* tipo 1. Existem fatores acessórios de virulência, como o plasmídeo *pO157*, que codifica enterolisina e serina protease *EspP*. Outra distinção está na localização da infecção, que em EHEC ocorre no intestino grosso, atacando o cólon.

As manifestações clínicas mais comuns são diarreia e colite hemorrágica. Em alguns casos as diarreias sanguinolentas evoluem para complicações conhecidas como Síndrome Urêmica Hemolítica (“Hemolytic Uremic Syndrome” = HUS), em decorrência da ação das Shiga toxinas que lesionam as células do endotélio renal. A HUS acomete principalmente crianças, e muitos pacientes desenvolvem problemas renais crônicos necessitando de diálise ou transplante de rins. A Trombose Púrpura Trombocitopênica (TTP) é outra complicação decorrente da infecção por EHEC, e está relacionada a pacientes adultos. Muitas vezes essas complicações podem ser fatais, principalmente em crianças e idosos, que são o maior grupo de risco. Existem também casos de portadores assintomáticos.

A dose infectante de EHEC é muito baixa, estimando-se menos de 100 UFC. É um patógeno de origem alimentar causador de significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo. O maior número de casos registrados envolve os países industrializados, porém também atinge os países em desenvolvimento. Existem diversos sorotipos dentro desse patótipo, sendo O157:H7 o principal patógeno de origem alimentar.

2.1.3 EHEC, VTEC (ou STEC) e *E. coli* O157:H7

Existem dois sistemas de nomenclatura para as toxinas produzidas por EHEC: no Reino Unido são nomeadas como verotoxinas ou verocitotoxinas (VT1 e VT2), enquanto nos EUA são conhecidas como Shiga toxinas (*stx1* e *stx2*) (CHAPMAN, 1999). Consoante a nomenclatura utilizada (VT ou ST), as cepas que as produzem são denominadas VTEC (*E. coli* verotoxigênica) ou STEC (*E. coli* Shiga-toxina). Para ser incluída na classe EHEC, a cepa deve possuir as mesmas características clínicas, epidemiológicas e patogénicas associadas a *E. coli* O157:H7, considerada o protótipo EHEC: produzir uma ou ambas toxinas, apresentar plasmídeo pO157 e lesões epiteliais do tipo A/E, além de estar associada com colite hemorrágica. Assim, EHEC constitui um subgrupo de VTEC (KARMALI, 1989) e todas as considerações feitas no subitem 2.1.2.6 sobre *E. coli* enterohemorrágica são extensivas para *E. coli* O157:H7.

A distinção dentro de EHEC se faz entre as cepas O157 e as cepas não O157. A aparente predominância do sorotipo O157:H7 pode ser um reflexo da difusão do uso de meios (como Ágar sorbitol-MacConkey e Ágar sorbitol-MacConkey com metil-umbeliferil glucoronidase), que detectam apenas esse sorotipo particular de VTEC. Métodos laboratoriais que possam ser utilizados em laboratórios de rotina para detecção de cepas sorbitol positiva de EHEC O157 e não-O157 ainda são objeto de pesquisa. Entretanto, mesmo em estudos que incluem outros sorotipos, O157:H7 ainda é o mais comum sorotipo VTEC. Não obstante, o número de diferentes sorotipos VTEC isolados de fontes humanas continua crescendo e muitos também têm sido detectados em diversos animais (COIA, 1998; FAO/WHO, 2003; KARMALI, 1989; POSSÉ et al., 2008).

2.1.4 *E. coli* O157:H7

2.1.4.1 Características gerais

E. coli O157 não fermenta sorbitol nem produz β -glicuronidase, e essas características são utilizadas em laboratório para diferenciação com outras cepas, porém existem relatos de algumas cepas O157 sorbitol e β -glicuronidase positivas (BETTELHEIM et al., 2002; COIA, 1998; KEHL, 2002). A temperatura ótima de crescimento de *E. coli* O157 é de 37°C, não havendo crescimento a temperaturas abaixo de 8 a 10°C e acima de 44 a 45°C. Este sorogrupo sobrevive ao congelamento, havendo apenas uma diminuição na concentração (FAO/WHO, 2003). Segundo Jay (2005), o sorogrupo O157:H7, ao contrário da maioria das cepas de *E. coli*, não cresce a 44,5°C, sendo a temperatura máxima de crescimento em meio EC em torno de 42°C.

2.1.4.2 Resistência ao ácido

E. coli patogênica e não patogênica desenvolvem resposta ao “stress” quando submetidas a condições ambientais desfavoráveis, porém sabe-se que EIEC, EPEC e EHEC são significativamente mais ácido tolerantes que as cepas não patogênicas. Os fatores estressantes são relevantes para a sobrevivência de *E. coli* patogênica em alimentos e ambientes de processamento de alimentos. A adaptação das células bacterianas no trato gastrointestinal de bovinos pode induzir o sistema de ácido resistência em *E. coli* patogênicas e não patogênicas. *E. coli* O157 com sistema de ácido resistência induzido pode permanecer resistente ao ácido nos alimentos por

um determinado período. Uma vez ingeridos através do alimento contaminado, os organismos ácido adaptados são capazes de sobreviver à defesa ácido gástrica do hospedeiro humano e colonizar o intestino através de competição com os organismos comensais. São três os complexos sistemas de ácido resistência dependentes do meio: um sistema oxidativo e dois sistemas fermentativos (CHUNG et al., 2006). *E. coli* O157:H7 é considerado um dos sorotipos mais ácido resistentes e, segundo Berry e Cutter (2000), baseando-se as diferenças obtidas em relação à resposta ácido resistente, as cepas de *E. coli* O157:H7 podem ser divididas em três categorias: ácido resistentes permanentes (células não adaptadas que são naturalmente resistentes ao ácido, como por exemplo ATCC 43895); ácido resistentes induzíveis (sua resposta ao ácido aumenta com adaptação anterior, por exemplo ATCC 43889) e ácido sensíveis (por exemplo ATCC 43890). Em estudo comparativo desenvolvido por Samelis et al. (2003) com outros patógenos de origem alimentar (*Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* DT104), *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 também foi mais ácido resistente que os outros microrganismos.

2.1.4.3 Principais quadros clínicos

E. coli O157:H7 é considerada uma bactéria emergente e foi reconhecida como patógeno humano pela primeira vez em 1982, quando dois surtos de colite hemorrágica foram associados com o consumo de carne moída mal cozida contaminada. Desde então, vários casos de colite hemorrágica têm sido associados com *E. coli* O157:H7 e estima-se que de 5 a 10% das pessoas diagnosticadas com a infecção desenvolvam HUS, e desse total 5% morram na fase aguda da síndrome.

Crianças em idade pré-escolar e idosos têm mais propensão a contrair HUS. A TTP é outra complicação que acomete principalmente os adultos. Cerca de metade das pessoas infectadas com VTEC O157 necessita internação e a taxa geral de mortalidade em consequência de colite hemorrágica e HUS está em torno de 3%, sendo que em idosos essa taxa pode ser ainda maior (CDC, 2008; COIA, 1998; MENG et al., 2001). *E. coli* O157:H7 causa anualmente cerca de 73.000 casos de doença nos EUA, associada ou não à origem alimentar. Nesse país, entre os anos de 1982 a 2002 ocorreram 350 surtos, com 8.598 casos, sendo que desse número, 1.493 (17%) necessitaram internação, 354 (4%) desenvolveram HUS e 40 (0,5%) morreram (RANGEL et al., 2005).

2.1.4.4 Formas de transmissão

E. coli O157:H7 continua sendo o sorotipo VTEC mais comumente isolado de humanos, sendo amplamente encontrado no intestino de animais, especialmente ruminantes, muitas vezes de forma assintomática. A maioria das infecções está relacionada com o consumo de carne bovina mal cozida, porém outras formas de transmissão também ocorrem. A água é transmissora desse patógeno através da ingestão ou recreação em águas contaminadas. A transmissão zoonótica por contato direto ou indireto com ruminantes ou transmissão pessoa-pessoa foi descrita em alguns surtos (CDC, 2002; CDC, 2005; CDC, 2009; GETTY et al., 2000; GRANT et al., 2008; KARMALI et al., 1989). A importância de cada uma dessas vias de transmissão pode ser observada através dos dados levantados por Rangel et al. (2005) sobre os surtos causados por *E. coli* O157:H7 nos EUA, entre os anos de 1984 e 2002: 52% tiveram origem alimentar, 21% foram de origem desconhecida,

sendo que a transmissão pessoa-pessoa respondeu por 14%, enquanto a água foi responsável por 9%. A zoonose por contato animal e surtos relacionados com manipulação laboratorial corresponderam a 3 e 0,3% do total, respectivamente.

2.1.4.5 Alimentos relacionados com surtos

A carne moída bovina é considerada o principal veículo de *E. coli* O157:H7 causadora de enfermidades alimentares. Outros alimentos envolvidos são rosbife, salsichas, salame, saladas, espinafre, suco e sidra de maçã, leite cru, iogurte, maionese e broto de alfafa. (CDC, 2002; GETTY et al., 2000; GRANT et al., 2008; MacDONALD et al., 2004; MORGAN et al., 1993). Rangel et al (2005) apontaram que dos 8.598 casos registrados de infecção por *E. coli* O157:H7 nos EUA, 61% corresponderam a DTA. Dos 183 surtos alimentares, o alimento envolvido em 71 surtos (41%) foi a carne moída, em 42 (23%) não se conseguiu detectar a origem, em 38 (21%) a origem foram produtos vegetais, em 11 (6%) foram outros tipos de carne, em 10 (5%) outros alimentos e 7 (4%) envolveram produtos lácteos.

Uma extensa revisão sobre *E. coli* O157:H7 em linguiças fermentadas foi realizada por Getty et al. (2000). Os autores apresentaram os vários tipos de linguiça fermentada incriminados em surtos, discutindo a importância do controle das matérias-primas envolvidas em sua fabricação, tendo em vista ser esse um tipo de alimento “pronto”, não sofrendo nenhum processamento adicional como defumação ou cocção. Sua produção se dá exclusivamente através da inoculação de micro-organismos fermentadores produtores de ácido láctico que diminuirão o pH inicial e promoverão diferenças no gosto e sabor do alimento. MacDonald et al. (2004) descreveram a investigação de um surto envolvendo linguiça fermentada do tipo

húngaro no Canadá em 1999. Os resultados da investigação levaram os autores a concluir que os controles de rotina não identificaram a presença de STEC possivelmente por estes estarem em níveis muito baixos: apenas seis isolados de *E. coli* O157:H7 foram identificados de quatro amostras de linguiça produzidas em quatro datas diferentes em 1999.

2.1.4.6 Dose infectante

Pesquisas envolvendo voluntários sadios são realizadas com patógenos alimentares a fim de se detectar sua dose infectante. Kothary e Babu (2001) reuniram em uma revisão o resultado de várias pesquisas sobre o assunto. Diversas cepas de *E. coli* pertencentes aos grupos ETEC, EPEC, DAEC e EAEC foram usadas nesse tipo de estudo, porém o grupo EHEC, por questões éticas, não pode ser utilizado devido à severidade da doença e resultante mortalidade associada ao organismo. Com isso, a dose infectante para EHEC geralmente é estimada com base nas contagens do microrganismo encontradas em alimentos incriminados em surtos alimentares. Na revisão realizada por Getty et al. (2000) há descrição de achados de 0,3 a 15 células/g em um surto envolvendo carne moída e detecção de 0,3-0,4 células/g em pacotes fechados de linguiça.

2.1.5 *E. coli* O157:H7 no Brasil

2.1.5.1 Distribuição nos rebanhos e ambiente

Durante um período de um ano (1999-2000), Sandrini et al. (2007) investigaram 60 propriedades leiteiras em Pelotas (RS), e comprovaram a presença

de *E. coli* verotoxigênica em amostras de fezes de bovinos, de água ambiental, de água de consumo humano e de leite cru. A prevalência de VTEC foi de 48,9% (119/243) dos animais testados e em 95% (57/60) das propriedades pesquisadas, onde a prevalência de bovinos infectados variou de 0 a 100%, sendo a prevalência similar à encontrada em outros países. Em amostras de água de consumo humano, consumo animal e de leite cru a prevalência foi de 5%, 8,35% e 5%, respectivamente. Os sorogrupos de VTEC patogênicas (O157, O91 e O112) foram encontrados em apenas 2,9% (7/243) dos animais e em 11,7% (70/60) das propriedades.

A prevalência dos sorogrupos O157, O111 e O113 em 454 amostras de fezes, 54 amostras de água e 30 amostras de leite de propriedades leiteiras em Jaboticabal, SP, foi objeto de pesquisa de Vicente et al. (2005). A presença de STEC foi de 59,9% nas fezes, sendo que os sorogrupos O157, O111 e O113 foram detectados em 18,7%, 3,3% e 30,4% das amostras de fezes, respectivamente. Em relação a outros achados literários, os valores encontrados para STEC e *E. coli* O157 são relativamente altos, porém os autores ressaltam que os dados sobre prevalência de STEC e *E. coli* O157:H7 em bezerros são difíceis de serem comparados devido às diferenças nos métodos de procedimento e detecção usados nas pesquisas. Não se detectou sorogrupo O157 na água e leite analisados. Apenas 1,9% de STEC foi encontrado na água, sendo exclusivamente pertencente ao sorogrupo O113. Nas amostras de leite, apesar da presença de 3,3% de STEC, nenhum dos sorogrupos pesquisados foi detectado.

As fezes de 60 bovinos criados em confinamento foram analisadas quanto à presença de *E. coli* produtora de toxina de shiga. Das 463 colônias isoladas, 38

foram caracterizadas como STEC, sendo que sete dessas cepas foram confirmadas como O157:H7 (VON LAER et al., 2009).

2.1.5.2 Detecção de *E. coli* O157:H7 nos alimentos

Rodholpo e Marin (2007) realizaram análises de amostras de carne moída, moedor de carne e mãos de manipuladores em 23 açougues da cidade de Taquaritinga (SP), com fins de isolamento de *E. coli*. Das 287 cepas isoladas apenas quatro foram identificadas como STEC, possuindo gen *stx2*. Foi realizado antibiograma com as 287 cepas, e os resultados indicaram altos índices de resistência a diferentes agentes antimicrobianos, sendo os principais a tetraciclina, amoxicilina e cefalotina,

Em uma pesquisa com queijo tipo minas frescal produzido a partir de leite cru e comercializado em Araguaína (TO) foram isoladas *E. coli* em 48 (96,0%) das 50 amostras analisadas. Das 48 cepas isoladas, sete (14,0%) foram identificadas como pertencentes aos sorogrupos O125, O111, O55 e O119. Os sorogrupos O111 e O119 são reconhecidos na literatura científica como importantes patógenos no Brasil, sendo também isolados em bezerros. Os maiores índices de resistência das cepas aos antimicrobianos foram encontrados, em ordem decrescente, para cefalotina, ácido nalidíxico, doxiciclina, tetraciclina e ampicilina (PANETO et al., 2007).

Aleixo e Aver (1996) pesquisaram a ocorrência de *E. coli* enteropatogênica e enterotoxigênica em 36 amostras de alimentos de origem animal (leite pasteurizado, carne moída e queijo minas frescal). Em 86% das amostras analisadas houve presença de *E. coli*. A positividade para EPEC e ETEC foi de 11 (30%) e 24 (66%),

respectivamente. Os isolados foram altamente sensíveis aos antimicrobianos testados.

Silva (2004) pesquisou a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em 2.095 amostras, (1.111 de hambúrguer, 115 de ambiente industrial e 869 de vegetais) no período de 1997 a 1999, não encontrando ocorrência desta bactéria nos alimentos analisados. A autora ressalva que a amostragem é pequena se comparada ao volume de produção nacional, porém acredita que a ocorrência do patógeno no Brasil seja bem menor que em outros países, onde em amostragens similares detectou-se a presença de O157:H7 em 0,2 a 3,7% das amostras analisadas.

Das 60 amostras de carne bovina resfriada comercializadas na Grande São Paulo utilizadas para pesquisa de *E. coli* produtora de toxina de shiga, 40 foram positivas para o patógeno. Foram obtidos 236 isolados, sendo que dois foram confirmados sorologicamente para *E. coli* O157 (ALVARES et al., 2009).

2.1.5.3 Casos clínicos de EHEC

Em relação a casos clínicos, o primeiro caso de isolamento de cepa STEC em paciente com HUS no Brasil foi descrito por Guth et al. (2002) em uma criança de oito meses de idade, na cidade de São Paulo. A cepa de *E. coli* isolada das fezes da criança apresentou expressão para *stx1* e enterohemolisina, pertencendo ao sorotipo O26:H11. Esse sorotipo, segundo os autores, tem sido descrito como agente de colite hemorrágica e HUS em outros países, sendo o segundo sorotipo mais freqüente de STEC detectados em casos diarréicos em seu local de trabalho.

Irino et al. (2002) descreveram os primeiros casos de detecção de cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de infecção humana no Brasil, todas no estado de São

Paulo. A primeira cepa foi isolada em 1990 em um paciente com AIDS, de 18 anos de idade e que apresentava diarreia. As outras duas cepas foram isoladas de uma menina de quatro anos de idade com diarreia sanguinolenta e de um adulto com diarreia severa, no ano de 2001. As cepas foram caracterizadas como sorbitol negativo O157:H7, contendo a sequência *stx2*. O fenótipo enterohemolítico e a produção de *stx2* também foram observados em todos os isolados.

2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS

2.2.1 Conceitos e características gerais da fermentação

A fermentação é um dos mais antigos métodos de preservação de alimentos conhecido pela humanidade (TAMIME, 1990). Jay (2005) relata que vários foram os conceitos de fermentação ao longo da história, e baseando-se em vários outros autores, este apresenta a definição geral de que fermentação é “um processo no qual transformações químicas são realizadas em um substrato orgânico pela ação de enzimas produzidas por microrganismos”.

Sob o aspecto bioquímico, fermentação “é o processo metabólico no qual carboidratos e compostos relacionados são parcialmente oxidados, resultando em liberação de energia, sem qualquer aceptor de elétrons externo. Os aceptores finais de elétrons são compostos orgânicos produzidos diretamente da quebra de carboidratos. Conseqüentemente, ocorre a oxidação incompleta do composto original, resultando em liberação de apenas uma pequena quantidade de energia durante o processo. Os produtos da fermentação consistem em alguns compostos orgânicos, os quais são mais reduzidos do que outros” (JAY, 2005).

Vários são os tipos de alimentos fermentados, como é o caso de queijos maturados, iogurtes, conservas e linguiças fermentadas. Os microrganismos utilizados nessas fermentações realizam alterações alimentares benéficas: aumentam o prazo de validade em relação ao alimento original, além de desenvolverem no alimento sabor e aroma característicos, resultado direto ou indireto dos microrganismos fermentadores. Podem ainda aumentar a digestibilidade do alimento e a concentração de vitaminas (ADAMS; MITCHELL, 2002; FERREIRA, 1987; JAY, 2005). Apesar da variedade de alimentos fermentados existentes, a grande maioria é de origem láctea.

Os principais tipos de fermentação encontrados nos alimentos são: fermentação láctica, alcoólica, propiônica, do ácido cítrico, butírica e gasosa ou de coliforme. A fermentação láctica é realizada principalmente em produtos lácteos, como é o caso do iogurte. A fermentação alcoólica é utilizada na fabricação do pão e do kefir; as fermentações propiônica e do ácido cítrico são utilizadas em vários produtos lácteos, principalmente em vários tipos de queijo. As fermentações butírica e gasosa são indesejáveis no alimento, sendo consideradas defeito tecnológico no primeiro caso e higiene deficiente no segundo (FERREIRA, 1987).

2.2.2 Leites fermentados

Segundo Ferreira (1987), a origem do leite fermentado mistura-se com a do iogurte, havendo muitas teorias sobre o período histórico preciso de sua descoberta: para alguns já havia o desenvolvimento de um tipo de iogurte no período neolítico, quando da utilização do leite de animais domesticados estocados em cerâmicas. Alguns autores creditam a origem do iogurte aos nômades turcos, no século VIII,

enquanto outros o designam como oriundo de pastores da Península dos Bálcãs. O iogurte, nesses casos, foi resultado do acondicionamento do leite em estômago de bezerro que em contato com o calor do corpo do camelo, durante as viagens, possibilitou o desenvolvimento de bactérias fermentadoras.

O interesse por leites fermentados aumentou no século XX, após a divulgação por Ilya Metchnikoff de pesquisas que relacionavam a longevidade dos búlgaros ao consumo de leite fermentado. Esse pesquisador russo isolou um microrganismo do alimento lácteo, levantando a hipótese de que a microbiota era responsável pela inibição de bactérias putrefativas no trato intestinal (FERREIRA, 1987; ROBINSON; TAMIME, 1990).

Na Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), consta a definição de leites fermentados como “os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos”. Dentro desse grupo, ainda referente a legislação, enquadram-se o iogurte, o leite fermentado, o leite acidófilo, o kefir, o kumis e a coalhada. Outros leites fermentados, como o “buttermilk” e o “sour cream”, não são produzidos no Brasil, sendo comuns, como menciona Jay (2005), no comércio dos EUA.

Segundo Robinson e Tamime (1990) os diferentes tipos de leite fermentado são classificados de acordo com o método de fermentação e/ou processamento. Em geral essas fermentações envolvem microrganismos específicos, porém há muita similaridade no que diz respeito ao aspecto tecnológico de fabricação desses produtos lácteos.

2.2.3 Bactérias Ácido Láticas

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) são o grupo mais importante na fermentação de produtos alimentícios, por atuarem em diferentes tipos de alimentos (FERREIRA, 1987). São mesofílicas, podendo crescer, porém, sob temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. A grande maioria cresce numa faixa de pH entre 4,0 e 4,5, havendo algumas que podem crescer abaixo de 3,2 e outras acima de 9,6 (JAY, 2005).

As BAL compõem a categoria de microrganismos cujos limites não são bem definidos, sendo compostas de vários gêneros que incluem um considerável número de espécies capazes de produzir ácido láctico a partir de hexoses. São bactérias Gram positivas, catalase negativo, crescem desde condições microaerófilas até condições estritamente anaeróbicas e não formam esporos (FERREIRA, 2003; KLEIN et al., 1998; JAY, 2005)

As constantes redefinições e reagrupamentos podem explicar a dificuldade em se delimitar os diversos gêneros e espécies que compõem esse grupo de bactérias. Enquanto Ferreira (2003) aponta 15 gêneros como constituintes desse grupo (*Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*), para Jay (2005) são 12 os gêneros que o compõem: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*.

Uma possível explicação para essa constante alteração pode estar nos critérios utilizados para a taxonomia e nomenclatura bacteriana, pois atualmente a

taxonomia não se baseia mais apenas nos critérios fisiológicos, mas também nas características fenotípicas e genômicas reveladas em nível molecular, o que tem resultado em grandes mudanças nos grupos taxonômicos (KLEIN et al., 1998).

As BAL podem ser divididas em dois grandes grupos, baseando-se na característica de sua fermentação: homoláticas e heteroláticas. Essa divisão foi realizada por Kluver, e tem como base o produto final do metabolismo da glicose. As bactérias homofermentativas produzem quase que exclusivamente o ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem além do ácido láctico quantidades consideráveis de dióxido de carbono e/ou ácido acético, entre outros compostos. Deve ser ressaltado que algumas bactérias homoláticas têm a capacidade de produzir ácido acético e láctico quando utilizam as pentoses. (FERREIRA, 1987; JAY, 2005).

2.2.3.1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Kandler e Weiss (1986) descreveram que as bactérias do gênero *Lactobacillus* são constituídas por células longas e finas, algumas vezes encurvadas e curtas, sendo comum a formação de cadeias. São microrganismos Gram positivo, não esporulados, raramente móveis. Quanto ao metabolismo fermentativo são obrigatoriamente sacarolíticos, tendo o ácido láctico como no mínimo metade de seu produto final. Outros produtos adicionais podem ser acetato, etanol, dióxido de carbono, formato ou succinato. São microaerófilos, raramente reduzem o nitrato, não liquefazem gelatina, sendo catalase e citocromo negativos. São extremamente fastidiosos, adaptados a substratos orgânicos complexos, necessitando não apenas de carboidratos fermentáveis, mas também de aminoácidos, peptídeos, derivados de

ácidos nucléicos, vitaminas, sais e ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos. Crescem a temperatura entre 2-53°C, possuindo um ótimo entre 30-40°C. O pH ótimo está entre 5,5-6,2 sendo que o crescimento geralmente ocorre em $\text{pH} \leq 5,0$. Em pH neutro ou levemente alcalino a taxa de crescimento é reduzida.

Segundo Robinson e Tamime (1990), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi o microrganismo detectado por Metchnikoff em sua pesquisa com iogurte, sendo na época denominado pelo pesquisador de *Bulgarian bacillus*. Posteriormente foi renomeado como *Thermobacterium bulgaricum* por Orla-Jensen, sendo atualmente uma subespécie de *Lactobacillus delbrueckii*, como afirmam Kandler e Weiss (1986).

Lactobacillus delbrueckii é homofermentativo e apresenta três subespécies: *delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis*. O *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermenta apenas os seguintes carboidratos: frutose, glicose, lactose, manose e sorbitol (KANDLER; WEISS, 1986).

2.2.3.2 *Streptococcus thermophilus*

As bactérias do gênero *Streptococcus* são Gram positivas, não formadoras de endosporos, cujas células são normalmente esféricas ou ovóides, menores que 2 μm de diâmetro, ocorrendo aos pares ou em cadeia, quando em meio líquido. A maioria são anaeróbias facultativas, podendo algumas necessitar de dióxido de carbono para o crescimento e outras serem estritamente anaeróbias. São catalase negativo e possuem requerimentos nutricionais complexos. Todos os estreptococos fermentam carboidratos, produzindo predominantemente ácido láctico, porém sem produção de gás. Pequenas quantidades de ácidos acético e fórmico, etanol e

dióxido de carbono também podem ser produzidas. Todas as espécies fermentam a glicose, resultando principalmente em L(+) ácido láctico. A utilização de outros carboidratos é útil para a identificação entre as espécies. A temperatura ótima de crescimento está em torno de 37°C, havendo grande variação de máxima e mínima entre as espécies. Muitas são comensais ou parasitas em seres humanos ou animais, sendo algumas altamente patogênicas. Uma pequena quantidade é saprófita e ocorre no meio ambiente (HARDIE, 1986; HARDIE; WHILEY, 1997).

Ferreira (2003) relatou que o gênero *Streptococcus* é o mais estudado dentre os componentes do grupo de bactérias ácido lácticas, sendo *S. thermophilus* a única espécie atualmente empregada na produção de alimentos.

O grupo *S. thermophilus* está incluído no grupo Oral (AXELSSON, 2004). Segundo Hardie (1986) e Robinson e Tamime (1990), a inclusão de *Streptococcus thermophilus* como uma subsespécie de *Streptococcus salivarius* é uma proposta baseada em pesquisas genéticas que apontam a similaridade entre as espécies. Os autores acrescentaram, porém, que muitos estudos taxonômicos baseados em características fenotípicas não dão base a essa vertente, não havendo sido, até o momento de suas publicações, uma exata nomenclatura estabelecida. Posteriormente, Hardie e Whiley (1997) apresentaram *Streptococcus thermophilus* como fazendo parte do grupo Salivarius, juntamente com *S. salivarius* e *S. vestibularis*. Axelsson (2004), porém, afirmou que essa inclusão foi rejeitada, tendo em vista o baixo número de cepas que apresentaram DNA-DNA homólogos. Apesar dessa afirmação, ainda se observa em diversos textos científicos a nomenclatura *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Essa bactéria é composta de células ovóides, com 0,7-0,9 µm de diâmetro, disposta aos pares ou em longas cadeias. Em temperatura de 45°C ocorrem células

e segmentos irregulares. Não produz amônia a partir de arginina. Não cresce em agar contendo 40% de bile ou 0,04% de telurito de potássio. Não reduz tetrazolium. Cresce em caldo com 2,5% de sal, porém não com 4%. Sobrevive a aquecimento de 60°C durante 30 minutos. A temperatura de crescimento varia entre 19 e 52°C, tendo como ideal 37°C. A diferenciação com outras espécies pode ser realizada através do rápido crescimento em leite litmus incubado a 45°C (HARDIE, 1986).

2.2.3.3 Ação inibidora das BAL e *Escherichia coli*

Considera-se em geral que as BAL inibem o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes do alimento em função da competição por nutrientes e a presença de inibidores produzidos pelas culturas iniciadoras “starters”. Os metabólitos inibidores incluem ácidos orgânicos, diacetil, acetoína, peróxido de hidrogênio, antimicrobianos e bactericinas. Diversas bacteriocinas têm sido isoladas nas últimas décadas, e seu efeito contra bactérias consideradas agentes etiológicos de doenças alimentares estudado. A eficácia da atividade inibitória de determinadas bacteriocinas contra patógenos Gram-positivos, tais como *Listeria monocytogenes*, tem sido comprovada em diversos experimentos científicos, porém até o momento sua ação contra microrganismos Gram-negativos ainda não foi bem caracterizada (MILLETTE et al., 2007; O’SULLIVAN et al., 2002). Para Adam e Mitchell (2002), a principal contribuição inibidora das bactérias ácido lácticas durante a fermentação é a produção de ácidos orgânicos em níveis iguais ou superiores a 100 mM, com a consequente redução do pH. Para garantir essa inibição é necessário que as bactérias ácido lácticas estejam em superioridade numérica em relação aos patógenos presentes no alimento.

Pesquisas envolvendo leites fermentados e *Escherichia coli* têm apresentado resultados muitas vezes discrepantes, havendo em alguns casos não apenas a permanência, como também a multiplicação deste patógeno em presença de BAL (Bactérias Ácido Lácticas). As variações de tratamento podem suscitar uma explicação para dados tão diversos, podendo ser encontradas na composição da matéria-prima, na cultura empregada (espécie de BAL; número de bactérias lácticas viáveis presentes no alimento; relação entre as diversas espécies de BAL) e no patógeno (sorotipo e concentração de *Escherichia coli* contaminante).

Ogawa et al (2001) realizaram fermentação *in vitro* de *E. coli* O157:H7 com *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus brevis*. Pôde-se observar que *L. casei* e *L. acidophilus* exerceram ação inibitória sobre o crescimento bem como atividade bactericida sobre a cepa STEC O157:H7. *L. brevis*, porém, não exerceu o mesmo efeito, demonstrando que nem todas as espécies de *Lactobacillus* possuem essa atividade. Enquanto para *L. casei* e *L. acidophilus* houve aumento do ácido láctico e diminuição do pH, quando comparados com o controle, para *L. brevis* houve manutenção dos mesmos níveis. Esse fato fez com que os autores concluíssem que o efeito bactericida do *Lactobacillus* sobre STEC é dependente da produção de ácido láctico e do efeito de redução do pH.

Chang et al. (2000) pesquisaram o crescimento e sobrevivência de seis cepas de *E. coli* O157:H7 em bebida láctea tendo como cultura “starter” *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCRC 11197 ou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Observou-se uma variação na população final de *E. coli* de acordo com as diferentes cepas utilizadas e o tipo de bactéria ácido láctica “starter” empregado. Em geral houve um crescimento da *E. coli* nas primeiras 36h, ocorrendo uma redução posteriormente, podendo em alguns casos ser encontrado o patógeno em leite fermentado com mais

de 10 dias de estocagem refrigerada. A adição de açúcar aumentou as chances de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 o que, segundo os autores, pode ser decorrente de um efeito protetor do açúcar sobre a acidez e susceptibilidade a substâncias antimicrobianas.

Quando comparado com iogurte tradicional contendo apenas *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, iogurte com adição de *Lactobacillus acidophilus* foi mais eficaz na prevenção da sobrevivência de *E. coli* O157:H7, reduzindo para níveis não detectáveis uma concentração de 10^2 UFC em 3h e de 10^4 e 10^6 UFC em 48 h, sendo o pH de 4,6 e 3,8, respectivamente. No iogurte tradicional a redução ocorreu em 48 h para concentrações de 10^2 e 10^4 UFC e 72 h para concentração de 10^6 UFC, sendo o pH de 4,0 e 3,96, respectivamente (KASIMOGLU; AKGÜN, 2004).

Em estudo *in vitro*, Barrantes et al. (2004) pesquisaram o possível efeito inibitório das bactérias lácticas presentes em duas marcas comerciais de iogurte sobre os patógenos *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* e sua conservação durante o tempo de estocagem. Em iogurte tradicional contendo *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* não houve detecção de *E. coli* a partir do 28º dia de estocagem, enquanto em iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* esse período caiu para o 16º dia.

Lee e Chen (2005), pesquisando a resistência de *Escherichia coli* O157:H7 durante processamento e estocagem de iogurte batido, encontraram maior persistência de *E. coli* em iogurte estocado a 4°C que a 15°C. Em caso de inoculação pós-fermentação, em iogurte estocado a 4°C, *E. coli* permaneceu detectável até o fim da estocagem (três semanas), indicando que as células que não passam pelo processo de fermentação sobrevivem melhor em iogurte refrigerado. Os autores relacionaram a maior persistência a 4°C com a menor queda de pH, pois

o iogurte estocado a 15°C atingiu, no fim da estocagem, pH de 3,99 a 4,10, enquanto o estocado a 4°C atingiu pH de 4,37 a 4,48 .

Mufandaedza et al. (2006) pesquisaram a ação de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* C₁ e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc 261 isolada ou adicionada de *Candida kefyr* sobre *Escherichia coli* 3339 isolada de paciente diarréico e *Salmonella enteritidis* 949575 inoculados antes e após a fermentação do leite. Apenas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* C₁ exerceu ação inibitória sobre os dois patógenos. Quando inoculada no início da fermentação, *E. coli* cresceu nas primeiras 18h, sendo significativamente inibida posteriormente. Com a inoculação pós-fermentação, não houve crescimento de *E. coli*, porém sua presença foi detectada no período de 24h. Apesar do pH final dos produtos ter sido o mesmo para todos os produtos fermentados, os autores associam esse resultado a uma rápida produção de ácido por parte de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* C₁, o que resulta em rápida queda de pH.

Com base nesses estudos, observa-se que a segurança do leite fermentado contaminado por *E. coli* é bastante variável, pois o organismo pode ser inibido ou não, bem como permanecer no alimento ou não, conforme o tipo de leite fermentado, a cultura ácido láctica presente (espécie e quantidade) e a temperatura de estocagem.

2.3 IOGURTE

2.3.1 Conceito e características gerais

Segundo a Instrução Normativa (IN) nº 46 (BRASIL, 2007) iogurte é um leite fermentado “cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final”.

Chandan e Shalani (1993) definiram iogurte como um produto fermentado semisólido produzido a partir de uma mistura de leite padronizado pela atividade simbiótica da combinação de culturas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Os autores afirmaram que apesar de serem usados leites de vários mamíferos na fabricação de iogurte em várias partes do mundo, o uso industrial de iogurte utiliza, em sua grande maioria, leite de vaca. Quanto ao aspecto nutricional, geralmente contém mais proteína, cálcio e outros nutrientes que o leite, reflexo do conteúdo extra de sólidos não gordurosos resultante da adição de cerca de 12% de leite em pó desnatado ou leite condensado desnatado.

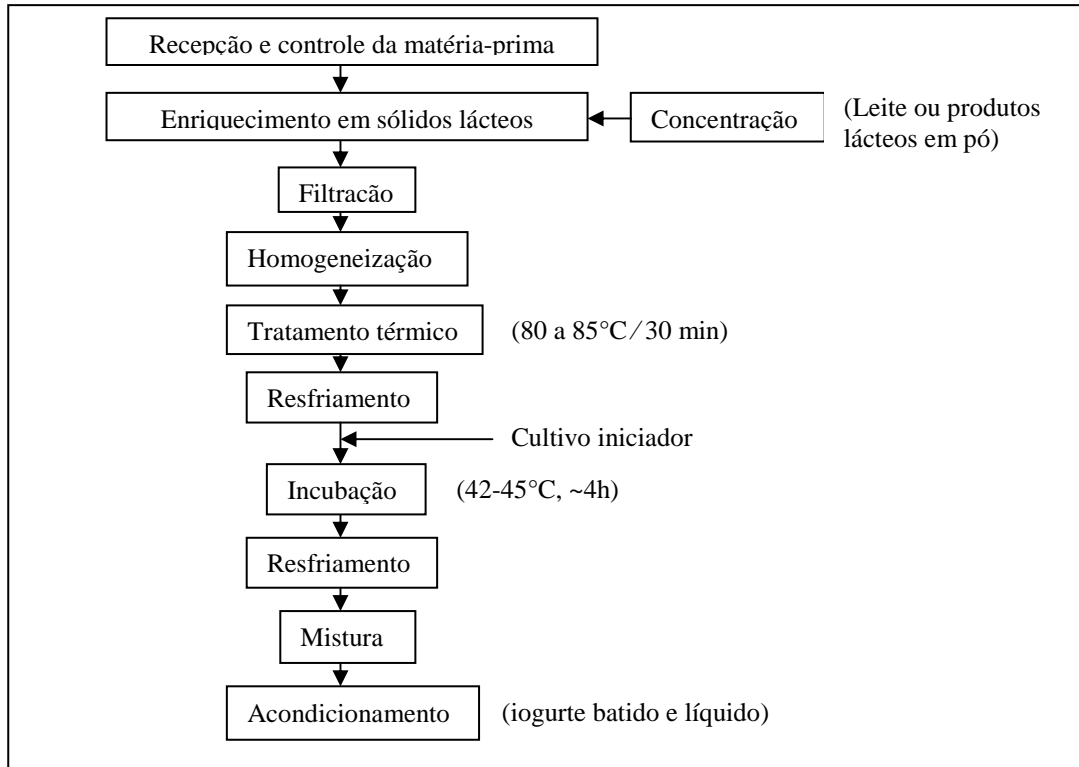
Quanto ao teor de gordura o iogurte pode ser classificado como: a) “com creme” – mínimo de 6% de gordura; b) “integral” – mínimo de 3% de gordura; c) “parcialmente desnatado” – máximo de 2,9% de gordura; e d) “desnatado – máximo de 0,5% de gordura (BRASIL, 2007).

Dependendo da natureza físico-química do coágulo o iogurte pode ser dividido em tradicional (textura firme), batido (textura cremosa, resultante da quebra da massa após o resfriamento) ou líquido (quebra da massa antes do resfriamento). Quanto ao sabor e aroma, pode ser natural (sem adição de flavorizantes), com frutas ou aromatizado com flavorizantes (ORDOÑEZ, 2005).

Nas comunicações técnicas constam que o açúcar deve ser adicionado em no máximo 10% (ENGETCNO, 2007). Apesar do aumento do consumo de iogurte “light” no Brasil nos últimos anos, ainda há uma clara preferência por iogurtes fabricados com açúcar, que apresentam maior aceitação quanto aos atributos sensoriais (MORAES, 2004). Também na Argentina se observa uma preferência local por iogurtes com alto teor de açúcar (BIROLLO et al., 2000).

O tratamento térmico do leite para fabricação de iogurte deve ser mais severo que o usado na pasteurização convencional. O aquecimento térmico de 85°C por 30 minutos ou 95° por 5 a 10 minutos possui as seguintes vantagens: elimina todos os microrganismos patogênicos não-esporulados; reduz consideravelmente a carga microbiana, facilitando o crescimento da cultura “starter” por ausência de competidores; reduz a quantidade de oxigênio do leite, favorecendo o crescimento das culturas lácticas microaerófilas; ocorre quebra dos constituintes do leite, especialmente proteínas, liberando peptonas e grupos sulfidrilas os quais proveem nutrição e condições anaeróbicas para as culturas “starter”; desnatura e coagula as albuminas e globulinas do leite o que aumenta a viscosidade e melhora a estabilidade do gel do produto (CHANDAN; SHALANI, 1993; ORDOÑEZ, 2005; ROBINSON; TAMIME, 1990).

As principais fases de fabricação de iogurte em uma linha aberta de processamento estão esquematizadas no Quadro 1.



Quadro 1. Esquema de uma linha aberta de processamento de iogurte (adaptado de ORDÓÑEZ, 2005)

2.3.2 Aspectos bacteriológicos: culturas iniciadoras

Culturas iniciadoras ou culturas “starters” são culturas específicas empregadas na fabricação direcionada do leite fermentado. A cultura pode ser simples ou mista, caso possua uma ou mais espécie bacteriana, respectivamente (FERREIRA, 1987). Para a produção de iogurte emprega-se tradicionalmente a cultura mista de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Esses microrganismos são simbióticos, um beneficiando-se do crescimento do outro. Em geral são empregados na proporção 1:1, podendo haver outras proporções como 2:1 e 3:1 de cocos:bacilos. O *Streptococcus thermophilus* cresce mais rápido, abaixando o pH do meio e produzindo formiato durante o metabolismo da lactose e CO₂ a partir da uréia presente no leite. A diminuição do pH e os metabólitos produzidos favorecem o desenvolvimento do *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Este último, ao se

multiplicar, desdobra parcialmente a caseína e libera diversos aminoácidos como valina, ácido glutâmico, triptofano, metionina e histidina, essenciais para o crescimento de *S. thermophilus*. Observa-se que ambos crescem melhor juntos que separados, havendo uma aceleração do metabolismo e produção de ácido em menor tempo de incubação, que gira em torno de 4 h a 42°C (FERREIRA, 1987; JAY, 2005; ORDOÑEZ, 2005; ROBINSON; TAMIME, 1990).

Tanto o Codex Alimentarius (CODEX, 2003), quanto a Instrução Normativa nº 46, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), especificam que os microrganismos “starters” devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto durante o prazo comercial, apresentando uma contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo 10^7 UFC/g. A utilização de cultivos liofilizados disponíveis no comércio permite que as BAL atinjam uma concentração entre 10^8 e 10^9 UFC/mL no produto final.

2.3.3 Aspectos físico-químicos: pH e acidez titulável

O pH e a acidez titulável do iogurte são influenciáveis conforme as condições de elaboração e armazenamento do iogurte.

Com o aumento da concentração de ácido láctico a partir da quebra da lactose pelos microrganismos, ocorre o aumento da acidez, e o pH decresce. Ao alcançar o ponto isoelétrico das proteínas do leite, em torno de 4,6-4,7, ocorre a coagulação e formação do gel. Segundo Ordoñez (2005), o gel produzido em leites fermentados por microrganismos é diferente daquele induzido enzimaticamente. O primeiro é mais frágil e desfaz-se mais facilmente, pois não muda sua permeabilidade durante

as primeiras 24 horas, sendo essa característica possivelmente um efeito resultante da ação das proteinases das culturas “starters”.

Ácido láctico é o principal ácido orgânico resultante do catabolismo da lactose pelos microrganismos homofermentativos durante a fermentação do iogurte, conferindo a acidez característica do iogurte. Em geral os cocos podem produzir 0,5% de ácido láctico e os bastonetes, de 0,6 a 0,8% em pH de 4,2 a 4,5 (JAY, 2005). Na IN nº 46 (BRASIL, 2007) consta como padrão que a acidez titulável do iogurte deve ser no mínimo 0,6 a 1,5% de ácido láctico/g. Outros compostos são produzidos em menor quantidade (diacetil e acetaldeído) e estão implicados na produção de sabor e aroma.

O pH de um iogurte pode alcançar valores de 3,8 a 4,0 (ORDOÑEZ, 2005), e apesar de não haver um padrão específico para o pH do iogurte na legislação, sua técnica de fabricação típica consiste em um produto com pH final entre 4,2 e 4,5. A pós acidificação é o fenômeno da manutenção do decréscimo do pH durante estocagem e venda do iogurte. Segundo Beal et al. (1999), esse decréscimo pode ser explicado pelo contínuo metabolismo das bactérias ácido lácticas durante a refrigeração, e é afetado pelas cepas usada na fabricação do iogurte. O principal decréscimo ocorre na primeira semana, quando há maior consumo de lactose e produção de ácido láctico e galactose.

Em 136 amostras de iogurte com frutas comercializadas na cidade de São Paulo, Rodas et al. (2001) encontraram pH médio de 4,01, sendo que o valor mínimo foi de 3,60 e o máximo de 4,30. Os valores de pH encontrados por Martin (2002) para iogurte natural e integral comercializado em Piracicaba (SP) caíram de 4,36 para 4,18 durante os 30 dias pesquisados, enquanto a acidez titulável aumentou de 0,73 para 1,17% de ácido láctico.

2.4 SEGURANÇA DOS ALIMENTOS FERMENTADOS

Nos dados epidemiológicos disponíveis há indícios que alimentos fermentados são considerados produtos com bom nível de segurança, principalmente quando se leva em consideração que cerca de 30% de todo suprimento alimentar consumido no mundo ocorre na forma de alimento fermentado (KNORR, 1998). Quando se observam, porém, as notáveis exceções em que alimentos fermentados estão associados com surtos, explica-se a importância da preocupação por parte da indústria e dos órgãos governamentais no que diz respeito a produção de alimentos seguros (ADAMS; MITCHELL, 2002). Com efeito, alguns surtos alimentares envolveram salame e linguiça fermentados contaminados com *E. coli* nos EUA e Austrália, sendo dois ocasionados por *E. coli* O157:H7 e produtores de casos de HUS (GETTY et al., 2000). No Reino Unido, um surto envolveu iogurte de fabricação local, causando 16 casos de infecção por *E. coli* O157:H7. Crianças com idade igual ou menor a 10 anos foram o principal grupo atingido, sendo que cinco delas desenvolveram HUS. Avaliando o processo de produção de iogurte, alguns pontos de contaminação cruzada foram detectados, como por exemplo, equipamentos sem imediata desinfecção, sendo utilizados tanto para leite cru quanto para leite pasteurizado inoculado com cultura “starter”. Outras áreas também foram consideradas potenciais contaminantes: era possível caminhar pela área de produção com botas enlameadas vindo da fazenda, bem como os latões de iogurte eram colocados diretamente no chão da área de produção e diversas vezes levantados e abaixados durante o processo produtivo (MORGAN et al., 1993). Outros dois surtos associados a iogurte foram descritos por Evans et al. (1999) e O'Mahony et al. (1990), causados, respectivamente por *Salmonella typhimurium*

DT170 e *Clostridium botulinum* tipo B. No primeiro surto, a suspeita dos epidemiologistas recaiu sobre uma contaminação cruzada com carne crua de carneiro, pois o iogurte era estocado no mesmo local, sendo usado como molho para produção de “kebab”. No segundo surto, envolvendo 27 casos e uma morte, a contaminação do iogurte se deu após a fermentação e batição, no momento da introdução de conserva de avelã para adição de sabor, antes do envase.

Para Adams e Mitchell (2002), os surtos ocorridos indicam a importância de se promover uma avaliação do risco microbiológico “microbiological risk assessment” em alimentos fermentados, oferecendo uma poderosa e valiosa ferramenta para o sucesso de se controlar os perigos e promover a segurança alimentar, permitindo que esses alimentos sejam consumidos com segurança.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTES INTEGRAL E DESNATADO CONTAMINADOS LABORATORIALMENTE PÓS-FERMENTAÇÃO

Introdução

Os alimentos fermentados foram considerados durante um longo período como alimentos seguros devido a seu baixo pH e capacidade de inibição de microorganismos. Após vários surtos, entretanto, a presença de patógenos causadores de doenças transmissíveis por alimento em tais produtos tem se tornado uma grande preocupação nas décadas recentes (1, 35).

Escherichia coli O157:H7 é um importante patógeno causador de doenças transmissíveis por alimento. Pode ser definido como um membro do grupo enterohemorrágico (EHEC) e pode causar algumas doenças graves, como a colite hemorrágica, trombocitopenia trombótica púrpura e síndrome urêmica hemolítica. Crianças e idosos fazem parte do grupo mais susceptível a sua patogenicidade (8, 24, 34). A grande resistência ao ácido de *E. coli* O157:H7 é considerada uma das principais causas de surtos em alimentos fermentados contaminados. Sua

capacidade de infectar com doses mínimas de até 10 UFC/mL é também um importante mecanismo de doenças infecciosas e surtos de alguns alimentos fermentados com baixos níveis do patógeno podem estar associados com um possível efeito protetor da gordura (1, 6, 15, 20).

Tem ocorrido um aumento no número de estudos para determinar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em vários leites fermentados disponíveis no mercado em todo o mundo (5, 10, 11, 26, 30). Isso é essencial para a saúde pública porque com esses conhecimentos será possível realizar um valor preditivo mais acurado sobre a segurança dos leites fermentados.

Iogurte é um alimento fermentado altamente consumido em todo o mundo. O procedimento de produção é diferente de acordo com os consumidores regionais, com algumas variações nos constituintes e no tipo de Bactéria Ácido Lática (BAL) ou nas concentrações usadas nas culturas iniciadoras (3). Iogurte foi considerado um alimento seguro por muitos anos. Esse conceito foi revisto após um surto de *Escherichia coli* O157:H7 relacionado com o consumo de iogurte produzido localmente no Reino Unido, envolvendo principalmente crianças (25).

A sobrevivência de *E. coli* em iogurte é dependente de muitas variantes tais como o tipo de cepa, a dose do inóculo, o estágio de contaminação (pré ou pós-fermentação) e o tipo de bactéria ácido láctica utilizado (5, 11, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 27, 31, 32).

A despeito do conhecido efeito protetor da gordura sobre patógenos como *E. coli* (20), não há referência específica quanto ao aumento do risco de doenças transmissíveis por alimento pelo consumo de iogurte contaminado desnatado comparado com iogurte integral.

O objetivo desta pesquisa foi determinar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em iogurte desnatado e integral durante 30 dias de estocagem sob refrigeração a 4,0°C ±2.

Material e Métodos

Ácido láctico iniciadoras – uma cultura comercial liofilizada mista (2:1) de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* denominada YC-X11 – Yo-Flex® (Chr. Hansen Ltda) foi usada para produção do iogurte. A cultura mista foi diluída em um litro de leite em pó desnatado reconstituído esterilizado, agitada para homogeneização e imediatamente usado em percentagem de inoculação de 50U DVS para 500 litros de leite.

Preparo do inóculo de *Escherichia coli* – *Escherichia coli* O157:H7 (CDC EDL-933) foi obtida da coleção de cultura do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

O organismo foi inoculado em Ágar Nutriente (Merck®, Darmstadt, Germany) e incubado a 37°C durante 24 horas. A cultura foi transferida para solução salina esterilizada (0,85% p/v, NaCl (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil)) com uma alça de platina até que a concentração alcançasse escala 0,5 de MacFarland. Uma suspensão de um mililitro de *E. coli* foi inoculada imediatamente pós-fermentação em 750 mL de iogurte. O nível de inoculação obtido foi de log 4,36 UFC/mL.

Produção de iogurte – Leite cru (4,5 litros distribuídos em erlenmeyer com 750 mL) foi aquecido a 83°C durante 30 minutos em banho-maria, resfriado imediatamente em banho com gelo a 45°C e inoculado com a cultura do iogurte.

Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 45°C até que sua acidez alcançasse 0,65% de ácido láctico ou pH 4,8.

Tipos de iogurte – Os diferentes tipos de iogurte foram manufacturados com dois tipos de leite cru: leite integral (3,4% v/v de gordura) e leite desnatado (<0,5% v/v gordura). Cada tipo foi dividido em partes iguais após a fermentação. A metade foi inoculada com *Escherichia coli* O157:H7. O iogurte remanescente foi utilizado como controle negativo. Amostras (50 mL) foram transferidas para potes de iogurte de prolipropileno estéreis, identificadas e estocadas refrigeradas a 4,0°C ± 2,0 durante 30 dias.

Análises bacteriológicas – A qualidade bacteriológica do leite cru foi determinada pela contagem total em placas de aeróbios mesófilos, com diluições seriadas do leite em solução salina peptonada estéril (0,1% p/v de peptona (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil), contendo 0,85% p/v de NaCl) e técnica de plaqueamento em profundidade com o meio Ágar Padrão para Contagem (Merck®, Darmstadt, Germany).

Imediatamente após a pasteurização, uma amostra foi coletada para assegurar sua qualidade através de contagem em placas de aeróbios mesófilos e verificação da ausência de coliformes totais e termotolerantes através do método padrão de Número Mais Provável (NMP) (2).

A enumeração de bactérias ácido lácticas foi realizada através de diluições seriadas do iogurte em solução de citrato de sódio 2% (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) (29) e técnica de plaqueamento em profundidade nos seguintes meios: Agar M17 (Himedia®, Mumbai, Índia) para *S. thermophilus* e Agar MRS (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) para *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus*. O primeiro foi incubado aerobicamente a 42°C (33, modificado) durante 48 horas e o segundo em jarra de

anaerobiose com atmosfera de CO₂ a 37°C durante 48 horas. As análises foram realizadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20 e 30 dias após a produção.

E. coli O157:H7 foi enumerada através de diluição seriada do iogurte em solução salina peptonada e plaqueamento em profundidade em meio VRBA (“Violet Red Bile Agar”, Merck®, Darmstadt, Germany). A contagem das placas foi realizada após incubação aeróbica a 37°C durante 24 horas. Populações viáveis de *E. coli* O157:H7 foram determinadas diariamente a partir do dia zero até a ausência de detecção.

Foram realizados esfregaços das colônias das placas e coloração pelo método de Gram para confirmação da morfologia bacteriana específica por microscopia de imersão. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram a média de cada contagem.

Análise de pH e acidez titulável – O pH e a acidez titulável do leite e iogurte foram monitorados a temperatura ambiente durante todos os dias de análise microbiológica. O pH foi medido com um peagômetro Quimis (Modelo Q-400A, Brasil) em 10 mL de alíquotas retiradas dos frascos. O eletrodo do pH foi calibrado com solução tampão (Merck®) de pH 4,0 e 7,0. Para medir a acidez titulável, 10 mL das amostras foi titulado com 0,111 NaOH após a adição de 0,5 mL de fenolftaleína até que a cor apresentasse tom levemente rósea persistente. O NaOH em mL foi registrado e os resultados foram expressos em termos de porcentagem de ácido láctico.

Análise estatística – o experimento foi procedido em triplicata. Os dados bacteriológicos foram convertidos para log UFC/mL antes da análise estatística. Diferenças nas contagens bacterianas, acidez e pH foram testadas através da análise de regressão.

Resultados e Discussão

A qualidade bacteriológica do leite usado na manufatura foi inicialmente determinada. A contagem total em placas do leite cru foi 4,64 log UFC/mL. O leite pasteurizado apresentou redução dos níveis de contagem total em placas para 1,47 log UFC/mL. Os coliformes totais e termotolerantes apresentaram níveis não detectáveis (<0,3 NMP/mL). O pH do leite cru integral e desnatado foi $6,88 \pm 0,05$ e $6,88 \pm 0,06$, respectivamente, e o ácido láctico foi de $0,15\% \pm 0,01$ em todos os tipos de leite. Analisando-se esses resultados, concluiu-se que o leite se encontrava dentro dos padrões de qualidade vigentes.

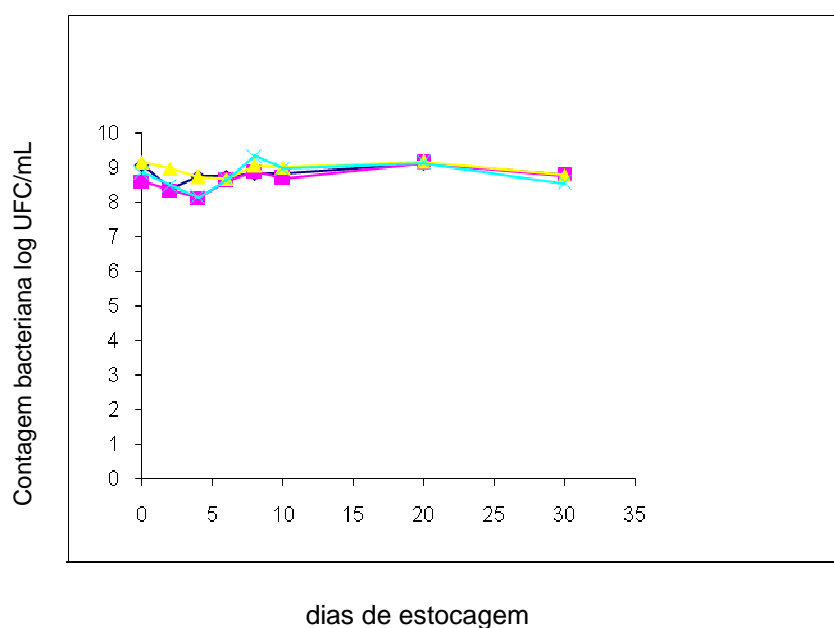


Fig. 1. Representação gráfica dos resultados das contagens de *Streptococcus thermophilus* em iogurtes estocados a 4°C: integral contaminado com *E. coli* O157:H7 (◆); desnatado contaminado com *E. coli* O157:H7 (▲); integral não contaminado (■); desnatado não contaminado (×).

Não houve diferença significativa entre as contagens de bactérias ácido lácticas nos iogurte integral e desnatado com ou sem contaminação por *E. coli* O157:H7. Durante os 30 dias de estocagem as contagens permaneceram entre log 8-9 UFC/mL em ambos *S. thermophilus* (Fig. 1) e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Fig.

2). Embora iogurte seja consumido em grande parte do mundo, preferências regionais necessitam ser melhor estudadas. Considerando que a cultura comercial iniciadora utilizada nesse experimento foi a mesma usada em muitas indústrias locais brasileiras, os achados corroboram os encontrados por Birollo et al. (3), que encontraram uma preferência por *S. thermophilus* dominante como iniciadoras industriais na Argentina. Esse fato indica uma possível preferência característica no Mercado Comum Sulamericano (MERCOSUL) em usar baixas proporções de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em cultura iniciadora de iogurte. O lactobacilo é o principal responsável pela produção de aroma no iogurte (28), porém também é responsável pelo contínuo aumento da concentração de ácido lático durante a estocagem refrigerada (9). Assim, a opção dos produtores locais pode ser reduzir o problema da pós-acidificação em detrimento do aumento do aroma.

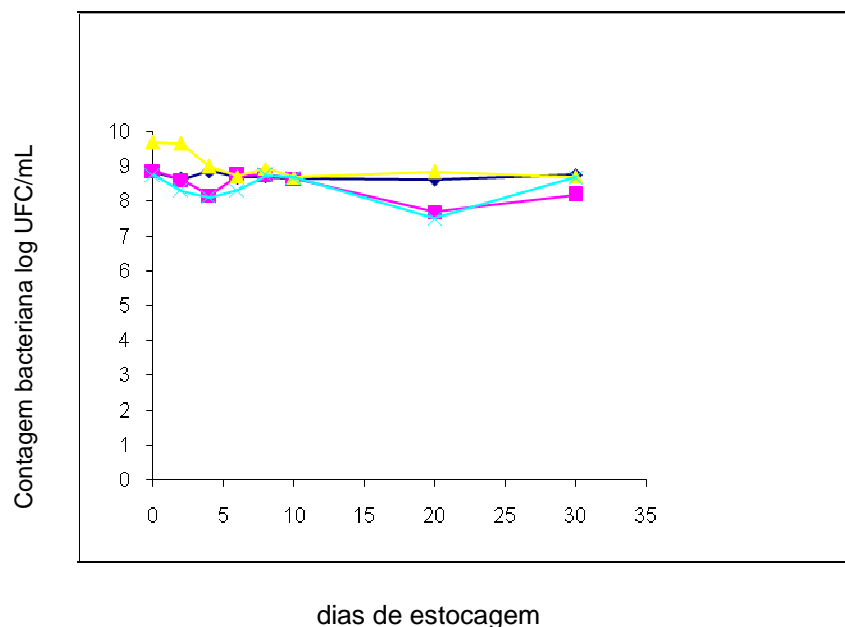


Fig. 2. Representação gráfica das contagens de *Lactobacillus bulgaricus* em iogurtes estocados a 4°C: integral contaminado com *E. coli* O157:H7 (◆); desnatado contaminado com *E. coli* O157:H7 (▲); integral não contaminado (■); desnatado não contaminado (×).

O pH e a acidez titulável não apresentaram diferença entre os tratamentos. O pH do iogurte imediatamente após a fermentação foi de 4,8 e caiu até 4,3-4,4 nas últimas semanas de estocagem. A porcentagem de ácido láctico foi inicialmente de 0,66 e 0,68 para iogurte integral e desnatado, respectivamente.

E. coli O157:H7 sobreviveu em iogurte integral e desnatado até quatro dias de estocagem não sendo detectável no quinto dia (Fig. 3). A população inicial foi de 4,36 log UFC/mL e a contagem decresceu cerca de 1 log por dia a partir do segundo dia. Com base nos resultados encontrados pode-se afirmar que o crescimento de *E. coli* O157:H7 foi inibido durante o período de estocagem e o patógeno foi mantido viável por poucos dias na fase lag, denotando pouca capacidade de crescimento nessas condições.

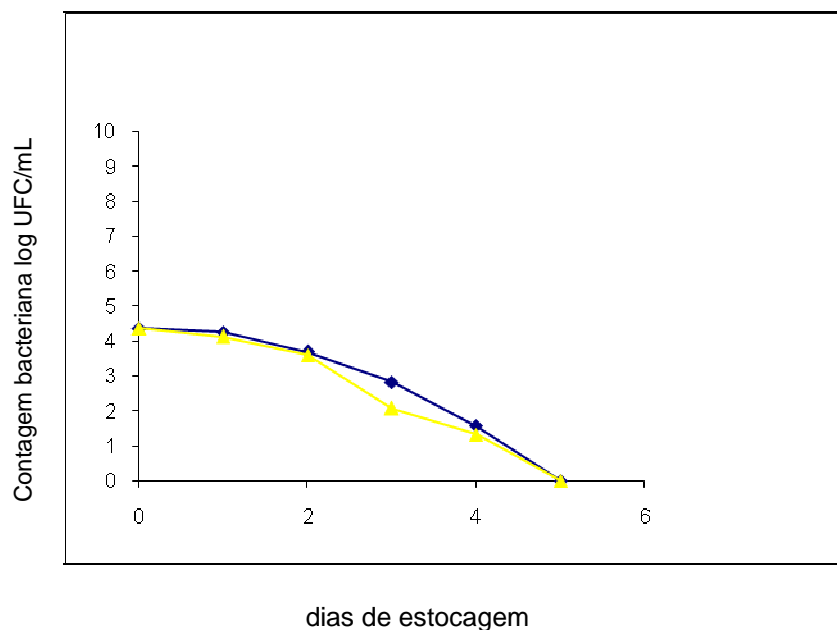


Fig. 3. Representação gráfica das contagens de *E. coli* O157:H7 em iogurtes integral (◆) e desnatado (▲) estocados a 4°C.

A mesma cepa de *E. coli* O157:H7 usada no presente estudo (CDC EDL-933) foi testada em algumas pesquisas envolvendo comparação de alimentos com diferentes teores de gordura. O conteúdo de gordura não influenciou a contagem populacional de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895 e outros) em linguiça tipo “Beef

Summer Sausage” com aproximadamente 8 e 17% de conteúdo de gordura (16). Govaris et al. (17) relataram diferença na sobrevivência de *E. coli* O157:H7 (uma mistura de EDL-932 e EDL-933) log 5,6 UFC/mL em iogurte de soro de leite, iogurte de leite de vaca e iogurte de leite de ovelha em contaminação pós-fermentação. O patógeno decresceu a um nível indetectável após 17, 14 e 12 dias em iogurte de leite de ovelha, iogurte de leite de vaca e iogurte de soro de leite, respectivamente. Todos os produtos tiveram contagens de *E. coli* O157:H7 significativamente diferentes ($P < 0,05$) após dois dias de estocagem a 4°C. Os autores sugerem que essas taxas de sobrevivência diferentes podem ser devido a diferença na composição do leite, pois nenhum efeito das BAL ou mudança de pH foi detectado. Na verdade, algumas dessas diferenças poderiam estar na gordura, com leite de vaca, leite desnatado de vaca e leite de ovelha apresentando 3,8; 0,3 e 7,2 de porcentagem de gordura, respectivamente. Entretanto, o teor de gordura deste estudo foi similar àquele do leite de vaca e leite de vaca desnatado, porém não os resultados, que não apresentaram diferença significativa na sobrevivência *E. coli* O157:H7 tanto em iogurte integral quanto desnatado. No experimento de Geornaras et al. (14) não houve diferença aparente no efeito antimicrobiano de ϵ -Poli-lisina contra *E. coli* O157:H7 (ATCC 43985 entre uma mistura de cepas) em extratos de leite integral e livre de gordura, concluindo esses autores que o teor de gordura não influenciou a atividade desse antimicrobiano. Uma possibilidade para esses achados pode ser que o teor de gordura do iogurte integral não seja suficiente para proteger a bactéria patogênica do ambiente lesivo, uma vez que os achados de influência da gordura sobre a redução das populações de *E. coli* O157:H7 foram determinados em alimentos com altos teores de gordura como linguiça calabresa e “jerked beef” com 30 e 20% de gordura, respectivamente (12, 13).

A grande variedade de possibilidades nos estágios de contaminação, nível do inoculo e adaptação ao ácido de células de *E. coli* O157:H7 no iogurte são algumas das questões abordadas por pesquisadores na literatura científica. EHEC O157:H7 sobreviveu melhor em iogurte batido quando contaminada no estágio de pós-fermentação em oposição à pré-fermentação (22). Maiores chances de sobrevivência de células ácido adaptadas de *E. coli* O157:H7 (10^7 UFC/mL) foram observadas quando inoculadas na pós-fermentação em contraste com as que não o foram. No primeiro caso a bactéria foi detectável até 22 dias de estocagem e no segundo 18 dias (31). Hsin-Yi e Chou (19) pesquisaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43985 e ATCC 43889) ácido adaptada e não ácido adaptada em iogurte comercial com baixos teores de gordura inoculado com $6,0 \log$ UFC/mL. O pH inicial foi 3,9 e ambas as cepas declinaram durante a estocagem a $7,0^\circ\text{C}$. A cepa ATCC 43889 não foi detectável com quatro e cinco dias para células ácido adaptadas e não ácido adaptadas, respectivamente. A cepa 43895 foi mais resistente, sendo detectável até o sexto dia de estocagem em ambos os casos. Em outra pesquisa com *E. coli* O157:H7 (E-D10) foi detectada a capacidade do patógeno sobreviver durante sete dias quando iogurte pré-fermentação (2% de cultura iniciadora) foi contaminado com inóculo de 10^3 e 10^7 UFC/mL, sendo o primeiro inóculo reduzido de $\log 3,04$ (pós-fermentação) para 2,72 (23). Em um experimento com inóculos de *E. coli* O157:H7 (EDL 931) a uma concentração de 10^2 , 10^4 e 10^6 UFC/mL em iogurte pré-fermentado, as culturas iniciadoras foram 2% (v/v) e as contagens de BAL estiveram em torno de 10^9 UFC/mL durante todo o período estudado. No tempo de fermentação (em torno de três horas) o patógeno aumentou 1 log e o pH alcançou 4,6. O tempo de eliminação de *E. coli* O157:H7 foi de 48 h para 10^2 e 10^4 UFC/mL e de 72 h para 10^6 UFC/mL (21).

Embora existam relatos em estudos sobre BAL que apontam para a existência de uma série de fatores antimicrobianos como as bacteriocinas, para Adams e Mitchell (1), a produção de altos níveis de ácido orgânico e o conseqüente decréscimo do pH são a principal contribuição inibitória das bactérias ácido lácticas durante a fermentação láctica. Os autores alertam sobre a necessidade de uma grande superioridade numérica de BAL sobre qualquer patógeno presente no alimento fermentado. Os níveis de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na presente pesquisa (cerca de 10^8 - 10^9 UFC/mL cada) são numericamente bem maiores que a população de *E. coli* O157:H7 (10^4 UFC/mL), e podem ser uma explicação para a diminuição da viabilidade do patógeno. O efeito inibitório de BAL é uma das razões para o estabelecimento de uma concentração mínima de bactérias ácido lácticas em iogurte em muitos países do mundo. No Codex Alimentarius e o Padrão de Identidade e Qualidade para Leites Fermentados no Brasil há exigência de uma população mínima de 10^7 UFC/mL para bactérias ácido lácticas totais (4, 7).

O aumento do consumo de iogurte desnatado no mercado está relacionado à procura de alimentos saudáveis pela população, porém não há muitos conhecimentos acerca de sua especificidade. Na presente pesquisa foram seguidos os procedimentos das manufaturas locais de iogurte a fim de que os resultados possam ser utilizados com mais precisão em uma caracterização de risco. A grande variedade de condições e manipulação dos fabricantes, entretanto, dificulta estabelecer qual o nível de uma contaminação natural do patógeno. Nesse estudo foi usado um nível de inóculo de *E. coli* O157:H7 relativamente baixo (10^4 UFC/mL) em uma contaminação pós-fermentação. Esse estágio do processamento é uma fonte potencial de contaminação em função do alto manuseio usado em pequenos laticínios durante a produção e envase. É importante lembrar que doses infectantes

menores que aquelas utilizadas nesse estudo podem causar doenças alimentares (15, 20) e devem ser consideradas em outros experimentos.

Concluindo, embora as contagens do patógeno tenham caído continuamente, a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 foi detectada até o quarto dia de estocagem, e isso pode ser um problema em pequenos laticínios locais, pois iogurtes produzidos recentemente são mais rapidamente disponíveis no mercado da região. O conteúdo de gordura do iogurte integral não foi suficiente a ponto de causar maior proteção sobre *E. coli* O157:H7 quando comparado com iogurte desnatado e esse resultado permite o uso de modelos preditivos baseados no conhecimento corrente sobre ambos os tipos de iogurte.

Referência bibliográfica

1. Adams, M.; Mitchell, R. (2002). Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 75-83.
2. Kornacki, J.L.; Johnson, J.L. (2001). *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). American Public Health Association, Washington. D.C., USA. p. 69-82.
3. Birollo, G.A.; Reinheimer, J.A.; Vinderola, C.G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Res. Int.* 33, 799-805.
4. Brasil. (2000). Resolução nº 05 de 13 de novembro de 2000. Oficializa os "Padrões de Qualidade e Identidade (PIQ) de Leites Fermentados". Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 27 nov. 2000, Seção 1, p. 9-12.
5. Chang, J-H.; Chou, C-C.; Li, C-F. (2000). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. *Food Microbiol.* 17, 579-587.
6. Chung, H.J.; Bang, W.; Drake, M.A. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *CRFSFS.* 5, 52-64.
7. Codex Alimentarius Commission. 2003. Codex Standard for fermented milk. Codex Stan 243-2003. Available at:

<http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf >
 Accessed 16 Dec 2007.

8. Coia, J.E. (1998). Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20, 1-9.
9. Dave, R.I.; Shah, N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria on yogurt. *J. Dairy Sci.* 81, 2804-2816.
10. Dlamini, B.C.; Buys, E.M. (2009). Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to acid in traditional and commercial goat milk amasi. *Food Microbiol.* 26, 58-64.
11. Evrendilek, G. A. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yogurt drink, plain yogurt and salted (tuzlu) yogurt: Effects of storage time, temperature, background flora and product characteristics. *Int. J. Dairy Technol.* 60 (2), 118-122.
12. Faith, N.G.; Parniere, N.; Larson, T.; Lorang, T.D.; Luchansky, J.B. (1997). Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and 20°C under air and vacuum and CO₂. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 47-54.
13. Faith, N.G.; Wierzba, R.K.; Ihnot, A.M.; Rorering, A.M.; Lorang, T.D.; Kaspar, C.W.; Luchansky, J.B. (1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in full- and reduced-fat pepperoni after manufacture of sticks, storage of slices at 4°C or 21°C under air and vacuum, and baking of slices on frozen pizza at 135, 191 and 246°C. *J. Food Prot.* 61, 383-389.
14. Geornaras, I.; Yoon, Y.; Belk, K.E.; Smith, G.C.; Sofos, J.N. (2007). Antimicrobial activity of ϵ -Polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. *Food Microbiol. Saf.* 72 (8), 330-334.
15. Getty, K.J.K.; Thebus, R.K.; Marseden, J.L.; Fung, D.U.C.; Kastner, C.L. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 8, 141-170.
16. Getty, K.J.K.; Synoground, A.; Roberts, M.N. (2007). Validation of heating conditions in production of direct acidified beef summer sausage for elimination of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Saf.* 27, 275-285.
17. Govaris, A.; Koidis, P.; Papatheodorou, K. (2002). Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes' milk yogurt. *J. Dairy Res.* 69, 655-660.
18. Gulmez, M.; Guven, A. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. *J. Appl. Microbiol.* 95, 631-636.

19. Hsin-Yi, C.; Chou, C-C. (2001). Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 189-195.
20. Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. Trad. Eduardo César Tondo et al. (6th ed.). Artmed, Porto Alegre.
21. Kasimoğlu, A.; Akgün, S. (2004). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 563-568.
22. Lee, S.M.; Chen, J. (2005). The influence of an extracellular polysaccharide, comprised of colonic acid, on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 during processing and storage of stirred yogurt. *LWT.* 38, 785-790.
23. Massa, S.; Altieri, C.; Quaranta, V.; De Pace, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 347-350.
24. Meng, J.; Feng, P.; Doyle, M. P. (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). American Public Health Association, Washington. D.C., USA, p.331-341.
25. Morgan, D.; Newman, C.P.; Hutchinson, D.N.; Walker, A.M.; Rowe, B.; Majid, F. (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111, 181-187.
26. Mufandaedza, J.; Viljoen, B.C.; Feresu, S.B.; Gadaga, T.H. (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 147-152.
27. Ogawa, M.; Shimizu, K.; Nomoto, K.; Tanaka, R.; Hamabata, T.; Yamasaki, S.; Takeda, T.; Takeda, Y. (2001). Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 135-140.
28. Robinson, R.K.; Tamime, A.Y. (1990). Microbiology of Fermented Milks. In: Robinson, R.K. (ed.). *Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk Products*. (2nd ed.). Elsevier Applied Science, London and New York, p.291-340.
29. Silva, N.; Amstalden, V.C.; Silveira, N.F.A. (2001). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 2 ed., Varela, São Paulo.
30. Simsek, B.; Sagdic, O.; Ozcelik, S. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during the storage of Ayran produced with different spices. *J. Food Eng.* 78, 676-680.

31. Tosun, H.; Seçkin, A.K.; Aktuğ Gönül, Ş. (2007). Acid adaptation effect on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented milk products. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31 (1), 61-66.
32. Tsegaye, M.; Ashenafi, M. (2005). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the processing and storage of Ergo and Ayib, traditional Ethiopian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 11-21.
33. Van de Castele, S.; Vanheruverzwijn, T.; Ruysen, T.; Van Assche, P.; Swings, J.; Huys, G. (2006). Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *Int. Dairy J.* 16, 1470-1476.
34. Weir, E.; Hair, K. (2006). *Escherichia coli* – sporadic case or an outbreak? *Can. Med. Assoc. J.* 174 (12), 1711.
35. Williams, R.C.; Isaacs, S.; Decou, M.L.; Richardson, E.A.; Buffett, M.C.; Slinger, R.W.; Brodsky, M.H.; Ciebin, B.H.; Ellis, A.; Hockin J.; The *E. coli* O157:H7 Working Group. (2000). Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *Can. Med. Assoc. J.* 162 (10), 1409-1413.

3.2 SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM IOGURTES COM DIFERENTES TEORES DE AÇÚCAR

INTRODUÇÃO

Iogurte é um tipo de leite fermentado altamente consumido em grande parte do mundo. *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são as culturas iniciadoras específicas para iogurte. Esses microrganismos devem se apresentar viáveis e com contagem mínima de 10^7 UFC/mL durante todo o período de durabilidade do produto (Codex Alimentarius, 2003). Muitos tipos diferentes de iogurte são produzidos conforme a preferência dos consumidores. Iogurtes com açúcar estão entre os leites fermentados mais apreciados e consumidos na América do Sul (Birolo et al, 2000; Moraes, 2004). A sacarose é o

adoçante mais usado em iogurte devido a sua disponibilidade e baixo custo (Slocum et al., 1988).

Leite fermentado em geral, e iogurte em particular, são considerados alimentos seguros, não havendo possibilidade de crescimento de patógenos. Apesar dos conhecidos efeitos antimicrobianos de bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas (O'Sullivan et al., 2002), a capacidade inibidora do alimento fermentado se deve principalmente à alta produção de ácidos orgânicos durante a fermentação, com conseqüente queda do pH, porém isso só acontece quando as bactérias ácido lácticas estão em ampla superioridade numérica em relação aos patógenos (Adams & Mitchell, 2002).

Apesar da conhecida segurança do iogurte, alguns surtos são descritos na literatura científica envolvendo esse leite fermentado. Os patógenos envolvidos são *Clostridium botulinum* toxina tipo B, *Salmonella thyphimurium* DT170 e *Escherichia coli* O157:H7 (O'Mahony et al., 1990; Morgan et al., 1993; Evans et al., 1999). A *Escherichia coli* O157:H7 foi associada com o consumo de iogurte de manufatura no Reino Unido. Dez dos 16 casos envolveram crianças e cinco deles desenvolveram síndrome urêmica hemolítica (Morgan et al., 1993). Esses exemplos mostram que apesar da segurança reconhecida nos alimentos fermentados, há algumas exceções que preocupam e tornam importante determinar a avaliação do risco microbiológico (Adams & Mitchell, 2002).

Escherichia coli O157:H7 é um patógeno emergente também conhecido como STEC devido a sua produção de toxina de shiga (Chapman, 1999). É um causador de doença de origem alimentar que causa problemas intestinais, produzindo colite hemorrágica. Os mais severos casos ocorrem em crianças e idosos, que estão no

grupo mais susceptível, os quais podem desenvolver síndrome urêmica hemolítica e trombose púrpura trombocitopênica (Weir, 2000; Weir & Hair, 2006).

E. coli O157:H7 está entre os patótipos de *E. coli* mais tolerantes ao ácido (Chung et al., 2006) e possui uma dose infectante muito baixa (Getty et al., 2000). Isso pode explicar seu envolvimento em muitos surtos de alimentos ácidos como iogurte, salame, cidra de maçã e maionese (Morgan et al., 1993; Getty et al., 2000; MacDonald et al., 2004). Essas são algumas das características indesejáveis de *E. coli* O157:H7 que tornam esse microrganismo uma das mais sérias ameaças quanto à segurança dos alimentos nos últimos anos, estimulando as pesquisas que focam em um maior conhecimento acerca desse patógeno (McClure, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a viabilidade de *E. coli* O157:H7 em iogurte com diferentes concentrações de sacarose durante 30 dias de estocagem sob refrigeração de $4,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de iogurte – O conteúdo de sólidos totais e gordura do leite cru integral utilizado neste experimento foi de $12,55 \pm 0,61$ e $4,1 \pm 0,55\%$ v/v, respectivamente. A pasteurização do leite foi obtida com o aquecimento de 83°C durante 30 minutos em um banho-maria, e imediato resfriamento até a temperatura de 45°C para inoculação da cultura iniciadora. O iogurte foi realizado com uma mistura comercial liofilizada mista com as bactérias iniciadoras tradicionais *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus (2:1) (YC-X11 – Yo-Flex® - Chr. Hansen Ltda). Um litro de leite em pó desnatado esterilizado foi usado para reconstituir e diluir a cultura mista. A porcentagem de inoculação foi

de 50 U de DVS para 500 litros de leite, como é de uso nos laticínios brasileiros. O leite com o inóculo foi agitado e incubado em um banho-maria a 45°C. O tempo de fermentação foi controlado através do monitoramento do pH e ácido láctico a cada 45 minutos em um recipiente de fermentação exclusivo para teste. O fim do processo de fermentação foi considerado quando a acidez atingiu 0,65% de ácido láctico ou pH 4,7. Em seguida o iogurte foi resfriado e batido com um bastão de vidro e as amostras (50 mL) foram transferidas para recipientes estéreis de polipropileno identificados. A estocagem do iogurte foi sob refrigeração a 4,0°C ± 2,0°C durante 30 dias.

Foram produzidos três tipos de iogurte com diferentes concentrações de sacarose: 0% (T0); 10% (T10) e 15% (T15). A adição do açúcar foi realizada antes da pasteurização do leite para assegurar a não contaminação por microrganismos.

Contaminação por *Escherichia coli* O157:H7 – Os tratamentos foram contaminados pós-fermentação com *E. coli* O157:H7 tendo o inóculo um nível de log 4,1UFC/mL. Para todos os tratamentos realizou-se um controle sem inoculação do patógeno.

E. coli O157:H7 foi obtida da Coleção de Culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. O microrganismo foi ativado em Agar Nutriente (Merck®, Darmstadt, Alemanha) a 37°C por 24h. A cultura foi transferida para solução salina esterilizada (0,85% p/v, NaCl, Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) com alça de platina. Quando a concentração alcançou a indicação de 0,5 no tubo Mac Farland, 1 mililitro da suspensão de *E. coli* foi retirado e inoculado em 750 mL de iogurte.

Qualidade bacteriológica do leite – a qualidade bacteriológica do leite cru e pasteurizado foi assegurada através da contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas. O leite foi diluído em solução salina peptonada (0,1% p/v de Peptona (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil), contendo 0,85% p/v NaCl) de forma seriada e plaqueado através da técnica de profundidade utilizando o meio Agar Padrão para Contagem (APC) (Merck®, Darmstadt, Alemanha). A ausência de coliformes totais e termotolerantes no leite pasteurizado foi detectada através do método padrão de Número Mais Provável (NMP) (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

Acidez Titulável e pH – A leitura de pH foi realizada em temperatura ambiente com um peagômetro Quimis (Modelo Q-400A, Brasil), inserindo um eletrodo de vidro em 10 mL de leite. O eletrodo foi calibrado com tampões (Merck®, Darmstadt, Alemanha) de pH 4,0 e 7,0. Para a acidez titulável, utilizou-se 10 mL das amostras, que foi titulado com 0,111 NaOH. Quando houve mudança da cor para rosa devido a adição prévia de 0,5 mL de fenolftaleína, o consumo de NaOH em mL foi anotado, e os resultados foram expressos em porcentagem de ácido láctico. O pH e a acidez titulável das amostras foram monitorados diariamente, do dia 0 ao dia 10, e aos dias 20 e 30.

Análises bacteriológicas – Solução salina peptonada estéril foi utilizada em diluições seriadas para todas as análises bacteriológicas do iogurte. As bactérias ácido lácticas foram analisadas nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20 e 30. A contagem de *S. thermophilus* foi realizada através do plaqueamento em profundidade com o meio Agar M17 (Acumedia®, Michigan, EUA) e incubação aeróbica a 42°C durante 48h. A contagem de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus foi realizada com

plaqueamento em profundidade utilizando-se o meio Ágar MRS (Acumedia®, Michigan, EUA) e incubação em jarra de anaerobiose contendo atmosfera enriquecida com CO₂ a 37°C durante 48h.

A contagem de *E. coli* O157:H7 foi realizada diariamente a partir do dia zero até a ausência de detecção em meio VRBA “Violet Red Bile Agar” através do plaqueamento em profundidade. As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C durante 24h.

Para confirmar a morfologia bacteriana específica, realizou-se esfregaço das colônias típicas e isoladas seguido de coloração pelo método de Gram.

Análise estatística – Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram a média das contagens. O experimento foi realizado duas vezes. Os valores médios da repetição foram calculados e os dados microbiológicos foram convertidos em log UFC/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite cru apresentou 0,15% de ácido láctico e pH 6,81. A eficiência da pasteurização do leite foi assegurada através do resultado das análises bacterianas: a contagem total em placas decresceu, chegando a log 2 UFC/mL; não houve detecção de coliformes totais e termotolerantes (<0,3 NMP/mL).

A fermentação foi finalizada com o pH 4,75 ± 0,05. Soukolis et al. (2007) afirmaram que, embora a predição das etapas de fermentação seja difícil devido à complexidade do processo fermentativo, o monitoramento do pH é uma ferramenta útil para checar o tempo de incubação, independentemente da formação de textura.

Uma mensuração foi realizada em cada tratamento após a batidura, inoculação do patógeno e distribuição nos frascos. O pH inicial foi diferenciado entre T0, T10 e T15, que apresentou pH 4,52, 4,44, 4,40, respectivamente. Não houve diferença aparente entre os tratamentos, porém o pH de T15 foi ligeiramente menor que os outros tratamentos durante todo o período de estocagem, com a diferença variando entre 0,21 e 0,16 unidades de pH a partir do 10º dia. Quando comparado com os controles, apenas o tratamento com 10% de sacarose (T10) apresentou variação perceptível, de 0,30 a 0,15 unidades de pH dos dias 0 a 4. Ao final da estocagem, o pH dos tratamentos T0 e T10 foi 4,32 e T15 foi 4,16.

O ácido láctico no dia zero foi de $0,64 \pm 0,04\%$ para os três tratamentos e não houve grande variação ao longo do tempo e entre os tratamentos, terminando os 30 dias de estocagem com 0,75, 0,69 e 0,74% em T0, T10 e T15, respectivamente.

Não existem muitos estudos atualmente sobre a ação deletéria de concentrações de sacarose em iogurte, porém a indústria brasileira recomenda não ultrapassar 10% de açúcar devido a pressão osmótica exercida sobre as BAL (Engetecno, s/d). Birollo et al. (2000) encontraram baixa proporção de *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* em muitos tipos de iogurtes argentinos. Os autores sugerem que a viabilidade dos lactobacilos possa ter sido afetada em função da alta concentração de açúcar utilizada, especialmente no iogurte com doce de leite, porém não informam quanto de açúcar foi adicionado a esses produtos. Oliveira & Damin (2003) e Thamer & Penna (2005) não encontraram diferença nas contagens de bactérias ácido lácticas usando iogurte com 0 e 8% ou 6, 7 e 8% de sacarose, respectivamente. No presente experimento, a sacarose não parece ter influenciado a contagem de BAL, mesmo em concentração de 15%. *S. thermophilus* permaneceu os 30 dias de

estocagem com log 9,0 UFC/mL e *L. bulgaricus* entre log 8,0-9,0 UFC/mL em todos os tratamentos.

Slocum et al. (1988) estudaram o efeito da sacarose na proteólise de iogurte durante incubação e estocagem a 4°C. Os autores detectaram que a proteólise foi dependente da concentração de sacarose em cinco culturas comerciais de iogurte. As culturas, porém, também tiveram um importante papel no efeito da sacarose sobre a proteólise, sendo mais ou menos sensíveis ao açúcar. No experimento não se realizou contagem de bactérias ácido lácticas, usando a concentração de aminoácidos para se determinar a proteólise. O estímulo à proteólise em iogurte com 0 a 7% de sacarose produzido com três culturas foi imputado ao crescimento dos microrganismos: o uso de sacarose por *S. thermophilus* e maior disponibilidade de lactose para *L. bulgaricus*. A menor proteólise em iogurte com 8 a 12% de sacarose foi relacionada pelos autores com a inibição do crescimento de *L. bulgaricus*. Iogurte com sacarose acima de 12% apresentou um aumento da proteólise e esse resultado foi atribuído à lise celular dos organismos sensíveis ao açúcar. Thomas & Crow (1983) demonstraram que muitas estirpes de *S. thermophilus* utilizam mais completamente a sacarose que a lactose. As moléculas de frutose e glicose originadas da fermentação da sacarose são utilizadas simultaneamente. A fermentação da lactose por *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, ao contrário, apenas metaboliza a glicose, excretando a galactose no meio (Axelsson, 2004).

Embora, no presente trabalho, os níveis de pH, ácido láctico e contagem de bactérias lácticas iniciadoras não tenham apresentado diferença aparente entre os tratamentos, o tempo de eliminação de *E. coli* O157:H7 foi diferente. A maior

sobrevivência do patógeno foi observada em iogurte com maior concentração de sacarose.

E. coli O157:H7 esteve entre log 3,6-4,2 UFC/mL até o 3º dia em todos os tratamentos (Fig. 4). A partir do dia 3 o patógeno decresceu 1 log por dia, não sendo detectável no 6º dia em T0. A sobrevivência do patógeno foi maior em T10 e T15, não sendo detectado no 8º e 9º dias, respectivamente. Esses resultados foram semelhantes com os estudos de Chang et al. (2000), que encontraram que 10^5 UFC/mL de *E. coli* O157:H7 933 sobreviveu menos que um dia em bebida láctea sem adição de sacarose, e não mais que um dia em bebida láctea com 5 e 8ºBrix, porém foi detectada até os dias 5-6 em bebida láctea com 15ºBrix fermentada com *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Os autores usaram seis estirpes de *E. coli* O157:H7 e diferentes quantidades de sacarose em leite fermentado com *L. bulgaricus* ou *L. casei*, concluindo que a extensão da proteção da sacarose variou com as diferentes estirpes do patógeno e que, em geral, o efeito protetor foi aumentado na medida que a quantidade de sacarose no leite fermentado cresceu.

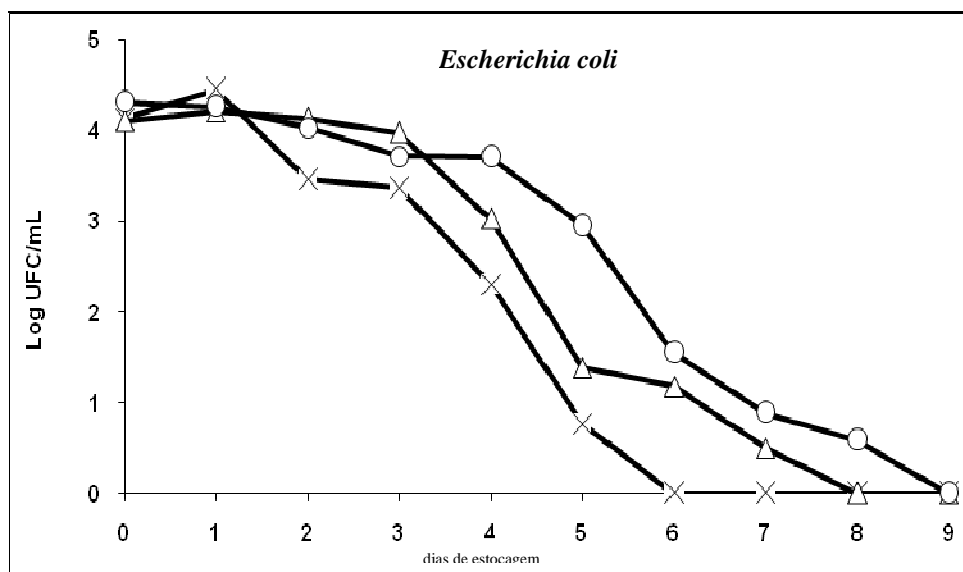


Fig. 4. Representação gráfica dos resultados das contagens de *E. coli* O157:H7 EDL 933 em iogurte sem adição de sacarose (x), com 10 % de sacarose (Δ) e com 15% de sacarose (O) estocados a $4,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

Alguns sistemas e enzimas da fermentação da sacarose pelas culturas iniciadoras são induzidos pela presença da sacarose no meio (Axelsson, 2004). Com isso, é possível que as BAL metabolizem primeiro a lactose por sua fácil disponibilidade. *E. coli* é capaz de fermentar a lactose e cerca de 50% das estirpes selvagens conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono (Holt et al., 1994). *Escherichia coli* EDL 933 é uma estirpe referência para O157:H7, e seu genoma foi sequenciado por Perna et al. (2001), que encontraram que muitos “clusters” detectados estavam envolvidos com habilidades estirpe-específica, como o consumo de sacarose, para sobreviver em diferentes nichos. A característica sacarose positiva de *E. coli* O157:H7 é codificada pelos gens *csc* (Jahreis et al., 2002). O efeito protetor da sacarose pode ser devido a maior disponibilidade desse açúcar no meio e seu uso pelo patógeno. Samelis et al. (2003) confirmaram a alta ácido resistência inerente de *E. coli* O157:H7 estirpe ATCC 43895Rif® e sugeriram que essa bactéria e outros patógenos podem usar a glicose e outros carboidratos fermentáveis presentes no alimento, com adaptação ao seu próprio ácido ou ao ácido produzido por outra bactéria fermentativa, aumentando sua capacidade de sobreviver durante o processamento e estocagem do alimento.

Como as BAL exercem efeito inibitório sobre patógenos como *E. coli* O157:H7 ainda não está bem determinado. O decréscimo do pH é considerado uma das principais ações, porém muitas substâncias tem sido relacionadas com efeitos antagonista, como os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e mesmo moléculas que interferem na regulação do “quorum sensing” (Ogawa et al., 2001; Adams & Mitchell, 2002; Mufandaedza et al., 2006; Milette et al., 2007; Medellin-Peña et al., 2007). Todas essas substâncias parecem atuar diretamente sobre a célula patogênica, inibindo seu crescimento e sobrevivência. Leslie et al.

(1995) demonstraram que a sacarose pode preservar células intactas durante a liofilização, aumentando a sobrevivência de *E. coli* devido à habilidade do açúcar em proteger a membrana celular e a estrutura protéica. É possível que essa habilidade possa ser usada para proteger o microrganismo da ação deletéria das bactérias ácido lácticas e pode ser outra hipótese para a maior sobrevivência de *E. coli* em iogurte com alto teor de açúcar.

Concluindo, as contagens de *E. coli* O157:H7 em iogurte contaminado pós-fermentação decresceram durante o período de estocagem, confirmando a ação protetora das bactérias ácido lácticas sobre o alimento. Embora ácido láctico, pH e contagens de BAL não tenham apresentado diferença aparente entre os tratamentos, *E. coli* O157:H7 sobreviveu durante 5, 7 e 8 dias em iogurte sem adição de sacarose, com 10% e 15% de sacarose, respectivamente. A ação do efeito protetor da sacarose sobre *E. coli* O157:H7 ainda não está inteiramente determinada e outros experimentos devem ser desenvolvidos nessa direção.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; MITCHELL, R. (2002). Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 75-83.
- AXELSSON, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, X.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects* (3rd ed.), Marcel Dekker, Inc.: New York, 1-66.
- BIROLLO, G.A.; REINHEIMER, J.A.; VINDEROLA, C.G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, **33**, 799-805.
- CHANG, J.-H.; CHOU, C.-C.; LI, C.-F. (2000). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. *Food Microbiology*, **17**, 579-587.
- CHAPMAN, P.A. (1999). *Escherichia coli* – Mechanisms of Virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**, 437-439.

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Codex Standard for fermented milk*. Codex Stan 243-2003. 2003. Available at: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf. Accessed 16 Dec 2007.
- CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**, 52-64.
- ENGETECNO. *Como fabricar iogurte e bebida láctea*. Available at: http://www.engetecno.com.br/port/tecnologia_iogurte.htm Accessed 16 Dec 2007.
- EVANS, M.R.; SALMON, R.L.; NEHAUL, L.; MABLY, S.; WAFFORD, L.; NOLAN-FARRELL, M.Z.; GARDNER, D.; RIBEIRO, C.D. (1999). An outbreak of *Salmonella typhimurium* DT170 associated with kebab meat and yoghurt relish. *Epidemiology and Infection*, **122**, 377-383.
- GETTY, K.J.K.; PHEBUS, R.K.; MARSDEN, J.L.; FUNG, D.Y.C.; KASTNER, C.L. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **8**, 141-170.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (ed.). (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- JAHREIS, K.; BENTLER, L.; BOCKMANN, J.; HANS, S.; MEYER, A.; SIEPELMEYER, J.; LENGELER, J.W. (2002). Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132. *Journal of Bacteriology*, **184**, 19, 5307-5316.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. (2001). *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). American Public Health Association, Washington. D.C., USA., pp. 69-82.
- LESLIE, S.B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 10, 3592-3597.
- MacDONALD, D.M.; FYFE, M.; PACCAGNELLA, A.; TRINIDAD, A.; LOUIE, K.; PATRICK, D. (2004). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiology and Infection*, **132**, 283-289.
- McCLURE, P. (2000). The impact of *Escherichia coli* O157 on the food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 749-755.
- MEDELLIN-PEÑA, M.J.; WANG, H.; JOHNSON, R.; ANAND, S.; GRIFFITHS, M.W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 13.

- MILLETTE, M.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. (2007). In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 314-319.
- MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B.C.; FERESU, S.B.; GADAGA, T.H. (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 147-152.
- MORAES, P.C.B.T. (2004). Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MORGAN, D.; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection*, **111**, 181-187.
- O'MAHONY, M.; MITCHELL, E.; GILBERT, R.J.; HUTCHINSON, D.N.; BEGG, N.T.; RODHOUSE, J.C.; MORRIS, J.E. (1990). An outbreak of foodborne botulism associated with contaminated hazelnut yoghurt. *Epidemiology and Infection*, **104**, 389-395.
- OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. (2001). Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, **68**, 135-140.
- OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. (2003). Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **23**, supl., 172-176.
- O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**, 593-604.
- PERNA, N.T.; PLUNKET III, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J.D.; ROSE, D.J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTBECK, E.J.; DAVIS, N.W.; LIM, A.; DIMALANTA, E.T.; POTAMOUSIS, K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ D.C.; WELCH, R.A.; BLATTNER, F.R. (2001). Genome sequence enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, **409**, 529-533.
- SAMELIS, J.; IKEDA, J.S.; SOFOS, J.N. (2003). Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella thyphimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 563-575.

- SLOCUM, S.A.; JASINSKI, E.M.; ANANTHESWARAN, R.C.; KILARA, A. (1988). Effect of sucrose on proteolysis in yogurt during incubation and storage. *Journal of Dairy Science*, **71**, 589-595.
- SOUKOULIS, C.; PANAGIOTIDIS, P.; KOURELI, R.; TZIA, C. (2007). Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *Journal of Dairy Science*, **90**, 6, 2641-2654.
- THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. (2005). Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **41**, 03, 393-400.
- THOMAS, T.D.; CROW, V.L. (1983). Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters*, **17**, 13-17.
- WEIR, E.; HAIR, K. (2006). *Escherichia coli* – sporadic case or an outbreak? *Canadian Medical Association Journal*, **174**, 12, 1711.
- WEIR, E. (2000). *Escherichia coli* O157:H7. *Canadian Medical Association Journal*, **163**, 2, 205.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 CDC EDL-933 em diferentes tipos de iogurtes contaminados pós-fermentação e produzidos com as culturas iniciadoras de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* permitiu as seguintes observações a partir dos dados obtidos:

A diferença no teor de gordura do iogurte produzido a partir do leite integral ou desnatado não exerceu diferença significativa na proteção de *E. coli* O157:H7, que não foi capaz de se desenvolver em ambos os iogurtes, porém permaneceu viável em contagens decrescentes até o quarto dia de estocagem sob refrigeração. É possível que, para exercer um maior efeito protetor, o teor de gordura do alimento tenha que ser mais alto que aquele presente no leite integral.

Iogurtes com diferentes teores de açúcar apresentaram diferença aparente na proteção à *E. coli* O157:H7. Enquanto em iogurte sem adição de sacarose detectou-se a presença do patógeno até o quinto dia de estocagem sob refrigeração, em iogurte produzido com 10 e 15% de sacarose a presença foi detectada até o sétimo e oitavo dias, respectivamente. A forma como se dá essa proteção ainda não está bem explicada, o que remete à necessidade de novas pesquisas relacionadas ao assunto.

Pode-se afirmar que as bactérias ácido lácticas presentes no iogurte, na concentração de log 8,0-9,0, foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7 na concentração de log 4,0, cuja presença no iogurte foi detectada por poucos dias em contagens decrescentes. Iogurtes fabricados com diferentes teores de açúcar, porém, devem ser analisados como produtos diferentes no que se refere ao risco microbiológico por *E. coli* O157:H7, devido às diferenças observadas na sobrevivência do patógeno de acordo com o teor de sacarose adicionado.

Pequenos laticínios, que comumente utilizam sistema aberto de produção, e abastecem o mercado consumidor da própria região, possuem maior risco de contaminação do iogurte no processo de pós-fermentação. Uma possível contaminação de iogurte por *E. coli* O157:H7 constitui um sério risco microbiológico, pois, apesar da ocorrência de inibição, o microrganismo foi capaz de sobreviver de quatro a oito dias, de acordo com o tipo de iogurte fabricado. Esse período significa tempo suficiente para uma possível ocorrência de doenças alimentares entre os consumidores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.; MITCHELL, R. Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 75-83, 2002.

ALEIXO, J.A.; AVER, G.P. Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in foods of animal origin in Southern Brazil. *Ciência Rural*, v. 26, n. 2, p. 247-250, 1996.

ALVARES, P.P.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M. Pesquisa de *Escherichia coli* produtora de toxina de shiga em cortes resfriados de bovinos comercializados na Grande São Paulo, Brasil. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas, PE. Anais... Disponível em <http://200.136.53.130:13580/cdrom/2009/sbm/cd/resumos/R2361-1.html> Acesso em 28 nov 2009.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, X.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects* (3rd ed.), Marcel Dekker, Inc.: New York, 2004, p. 1-66.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 54, n. 3, p. 293-297, 2004.V

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 673-681, 1999.

BETTELLHEIM, K.A.; WHIPP, M.; DJORDJEVIK, S.P.; RAMACHANDRAN, V. First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157. *Journal of Medical Microbiology*, v. 51, p. 713-714, 2002.

BERRY, E.D.; CUTTER, C.N. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1493-1498, 2000.

BRASIL. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.5. 24 out. 2007, Seção I.

BIROLLO, G.A.; REINHEIMER, J.A.; VINDEROLA, C.G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, v. 33, p. 799-805, 2000.

CDC CENTERS for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef – United States, June-July 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 51, n. 29, p. 637-639, 2002. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5129a1.htm> Acesso em 18 maio 2009.

CDC CENTERS for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with petting zoos – North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 54, n. 50, p. 1277-1280, 2005. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5450a1.htm> Acesso em 18 maio 2009.

CDC CENTERS for Disease Control and Prevention. Outbreak of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with a day camping petting zoo – Pinellas count, Florida, May-June, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 58, n. 16, p. 426-428, 2009. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5816a3.htm> Acesso em 18 maio 2009.

CDC. *Escherichia coli*. 27 mar 2008. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html Acesso em 08 maio 2009.

CHANDAN, R.C.; SHALANI K.M. Yogurt. In: : HUI, Y.H. (Ed.). *Dairy Science and Technology*. Handbook, vol. 2: Product Manufacturing. Edited by HUI, Y.H. Wley-VCH, 1993, p. 1-56.

CHANG, J.-H.; CHOU, C.-C.; LI, C.-F. Growth and survival of *Escherichia coli* O157-H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. *Food Microbiology*, v. 17, p. 579-587, 2000.

CHAPMAN, P.A. *Escherichia coli* – Mechanisms of Virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 43, p. 437-439, 1999.

CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 5, p. 52-64, 2006.

CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.E.; WILLIAMS, P.H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n.3, p. 365-378, 2003.

COIA, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 20, p. 1-9, 1998.

Codex Alimentarius Commission. 2003. Codex Standard for fermented milk. Codex Stan 243-2003. Available at:
<http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf > Accessed 16 Dec 2007.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

ENGETECNO ONLINE. Como fabricar iogurte. Disponível em:
http://www.engetecno.com.br/port/tecnologia_iogurte.htm Acesso em: 10 ago 2007.

EVANS, M.R.; SALMON, R.L.; NEHAUS, L.; MABLY, S.; WAFFORD, L.; NOLAN-FARRELL, M.Z.; GARDNER, D.; RIBEIRO, C.D. An outbreak of *Salmonella typhimurium* DT170 associated with kebab meat and yoghurt relish. *Epidemiology and Infection*, v. 122, p. 377-383, 1999.

FAO/WHO. Risk profile for enterohemorrhagic *E. coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and porks. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme / Codex Committee on Food Hygiene*. 35th session, Orlando, U.S.A., 27 January 1 February 2003. Disponível em
www.codexalimentarius.net/download/report/117/AI0313ae.pdf Acesso em 16 Jun 2007.

FERREIRA, C.L.L.F. *Produtos lácteos fermentados* (aspectos bioquímicos e tecnológicos). Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1987, 96 f.

FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas – caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. IN: *Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção*. (FERREIRA, C.L.L.F. editor), Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 7-33, 2003.

GETTY, K.J.K.; PHEBUS, R.K.; MARSDEN, J.L.; FUNG, D.Y.C.; KASTNER, C.L. *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v.8, p. 141-170, 2000.

GRANT, J.; WENDELBOE, A.M.; WENDEL, A.; JEPSON, B.; TORRES, P.; SMELSER, C.; ROLFS, R.T. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n.10, p. 1633-1636, 2008.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*, v. 130, p. 77-87, 2009.

GUTH, B.E.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.; IRINO, K. First shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n.5, p. 535-536, 2002.

HARDIE, J.M. Genus *Streptococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, Editores SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. v. 2, Baltimore: William & Wilkins. USA, p. 1043-1070, 1986.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification an overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83, 1S-11S, 1997.

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n.4, p.446-447, 2002.

JAY, J. M. *Microbiologia dos Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n.1, p. 15-38, 1989.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, Editores SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. v. 2, Baltimore: William & Wilkins. USA, p. 1208-1260, 1986.

KASIMOGLU, A.; AKGÜN, S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 39, p. 563-568, 2004.

KEHL, S.C. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n.8, p. 2711-2715, 2002.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, p. 103-125, 1998.

KOTHARY, M.H.; BABU, U.S. Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Safety*, v. 21, p. 49-73, 2001.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends of Food Science and Technology*, v. 9, p. 295-306, 1998.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, v.1.

LEE, S. M.; CHEN, J. The influence of an extracellular polysaccharide, comprised of colonic acid, on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 during processing and storage of stirred yogurt. *LWT*, v. 38, p. 785-790, 2005.

MacDONALD, D.M.; FYFE, M.; PACCAGNELLA, A. TRINIDAD, A.; LOUIE, K.; PATRICK, D. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiology and Infection*, v. 132, p. 283, 289, 2004.

MARTIN, A.F. *Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas*. Piracicaba, 2002, 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MELLIES, J.L.; BARRON, A.M.S.; CARMONA, A.M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and immunity*, v.75, n. 0, p. 4.199-4.210, 2007.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). Washington, DC: American Public Health Association, p. 331-341, 2001.

MORAES, P.C.B.T. *Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial*. Campinas, 2004, 128f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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 yoghurt. *Epidemiology and Infection*, v.111, p. 181-187, 1993.

MILLETTE, M.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*- fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 314-319, 2007.

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B.C.; FERESU, S.B.; GADAGA, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, v. 108, p. 147-152, 2006.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p. 135-140, 2001.

O'MAHONY, M.; MITCHELL, E.; GILBERT, R.J.; HUTCHINSON, D.N.; BEGG, N.T.; RODHOUSE, J.C.; MORRIS, J.E. An outbreak of foodborne botulism associated with contaminated hazelnut yoghurt. *Epidemiology and Infection*, v. 104, p. 389-395, 1990.

ORDOÑEZ, J.A. *Alimentos de Origem Animal*. In:_____. *Tecnologia de Alimentos*. Trad Fátima Murad, Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p. v. 2, p.67-83.

- O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potencial of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, v. 84, p. 593-604, 2002.
- PANETO, B.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN J.M. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n.2, p. 508-512, 2007.
- POSSÉ, B.; ZUTTER, L.De; HEYNDRICKX, M.; HERMAN. L. Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle feces samples using a new isolation protocol. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 227-235, 2008.
- RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 4, p. 603-609, 2005.
- ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.Y. Microbiology of Fermented Milks. In: Dairy Microbiology, vol. 2: *The Microbiology of Milk Products* (2nd ed.). Edited by ROBINSON, R.K. Elsevier Applied Science London and New York, 1990, p. 291-340.
- RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 599-602, 2007.
- RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, B.M.M.S.; SAKUMA, J.; TAVARES, L.Z.; SGARBI, C.R.; LOPES, W.C.C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurte com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 3, p. 304-309, 2001.
- SAMELLIS, J.; IKEDA, J.S.; SOFOS, J.N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 563-575, 2003.
- SANDRINI, C.N.M.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n.1, p. 175-182, 2007.
- SERVIN, A.L. Pathogenesis of Af/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n.2, p. 264-292, 2005.
- SILVA, N. *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. Campinas, 2004, 100 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.

- TAMIME, A.Y. *Microbiology of "Starter Cultures"*. In: Dairy Microbiology, vol. 2, The Microbiology of Milk Products (2nd ed.). Edited by ROBINSON, R.K. Elsevier Applied Science London and New York, 1990, p. 131-191.
- THEUNISSEN, J.; BRITZ, T.J.; TORRIANI, S.; WITTHUHN, R.C. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCT-based DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v. 98, p. 11-21, 2005.
- TORRES, A.G.; ZHOU, X.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 73, n.1, p. 18-29, 2005.
- VAN DE CASTEELE, S.; VANHEUVERZWINJN, T.; RUYSSSEN, T.; VAN ASSCHE, P.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese startes. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1470-1478, 2006.
- VICENTE, H.I.G.; AMARAL, L.A.; CERQUEIRA, A.M.F. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 217-222, 2005.
- VON LAER, A.E.; SOUZA, K.L.O.; IRINO, K.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina de shiga (STEC) em bovinos criados em confinamento. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas, PE. *Anais eletrônicos...* Disponível em <http://200.136.53.130:13580/cdrom/2009/sbm/cd/resumos/R1360-1.html> Acesso em 28 nov 2009.